

ISSN 0120-4157

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 36, Suplemento No. 2 - Enfermedades virales - Agosto de 2016
Bogotá, D.C., Colombia, S.A.



Portada: *Alouatta seniculus*, macho adulto, Cimitarra, Santander, 2009

Es una de las especies de primates no humanos de mayor distribución en Colombia que puede jugar un papel importante como huésped y centinela del virus de la fiebre amarilla.

Diego Soler-Tovar

Grupo de Epidemiología y Salud Pública, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Bogotá, D. C., Colombia

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 36, Suplemento No. 2 - Enfermedades virales - Bogotá, D.C., Colombia - Agosto de 2016

EDITORES INVITADOS	JAIME CASTELLANOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE BOGOTÁ, D.C., COLOMBIA	MARÍA CRISTINA NAVAS UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA MEDELLÍN, COLOMBIA
---------------------------	--	--

Comité Editorial

EDITORES	LUIS ALBERTO GÓMEZ Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	CARLOS ARTURO HERNÁNDEZ Bogotá, D.C., Colombia	RUBÉN SANTIAGO NICHOLLS Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos
-----------------	---	---	--

EDITORES ASOCIADOS	ENRIQUE ARDILA Bogotá, D.C., Colombia	LEONARD MUNSTERMANN Yale University School of Medicine New Haven, CT, Estados Unidos
	MIGUEL A. GUZMÁN Investigador Emérito Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	GUSTAVO C. ROMÁN Methodist Neurological Institute Houston, TX, Estados Unidos
	NANCY GORE SARAVIA Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas Cali, Colombia	OMAR SEGURA Federación Médica Colombiana Bogotá, D.C., Colombia
	RAÚL PARDO Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	ORLANDO TORRES-FERNÁNDEZ Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia

Comité Científico

ARNOLDO BARBOSA Universidad del Tolima Ibagué, Colombia	ANDRÉS DE FRANCISCO Organización Mundial de la Salud Ginebra, Suiza	JOHN MARIO GONZÁLEZ Universidad de los Andes Bogotá, D.C., Colombia
ANTONIO BERMÚDEZ Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	FERNANDO DE LA HOZ Universidad Nacional de Colombia Bogotá, D.C., Colombia	FELIPE GUHL Universidad de los Andes Bogotá, D.C., Colombia
JORGE H. BOTERO Universidad de Antioquia Medellín, Colombia	JOSÉ LUIS DI FABIO Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos	ANTONIO IGLESIAS Universidad Nacional de Colombia Bogotá, D.C., Colombia
VÍCTOR CÁRDENAS University of Texas El Paso, TX, Estados Unidos	JORGE HERNANDO DONADO Universidad Pontificia Bolivariana Medellín, Colombia	JORGE JARA Centers for Disease Control and Prevention, Regional Office for Central America and Panama, CDC-CAP Ciudad de Guatemala, Guatemala
ALBERTO CONCHA-EASTMAN Guatapé, Colombia	JOSÉ FIGUEROA World Health Organization Ginebra, Suiza	ERNESTO JARAMILLO Organización Mundial de la Salud Ginebra, Suiza
ZOILO CUÉLLAR Academia Nacional de Medicina Bogotá, D.C., Colombia	LUIS FERNANDO GARCÍA Universidad de Antioquia Medellín, Colombia	MARCELO LABRUNA Universidade de São Paulo São Paulo, Brasil
LUIS GABRIEL CUERVO Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos	ALBERTO GÓMEZ Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, D.C., Colombia	JAIRO LIZARAZO Hospital Universitario Erasmo Meoz Cúcuta, Colombia
PATRICIA DEL PORTILLO Corpogén Bogotá, D.C., Colombia	ENRIQUE GONZÁLEZ University of Texas Health Science Center at San Antonio San Antonio, TX, Estados Unidos	

Contenido

Editorial

La virología, más necesaria que nunca <i>Jaime E. Castellanos</i>	5
--	---

Presentación de caso

Hemorragia cerebral secundaria a trombocitopenia por varicela <i>Jairo Lizarazo, María Fernanda Castellanos, Claudia Rosa Omaña, Miguel Chaín, Sergio Villamizar</i>	10
---	----

Artículo original

Genotipificación, niveles de expresión y estado físico del virus del papiloma humano en pacientes colombianos con cáncer de células escamosas en la cavidad oral <i>Alveiro Erira, Leidy Angélica Motta, Andrés Chala, Andrey Moreno, Fredy Gamboa, Dabeiba Adriana García</i>	14
Análisis filogenético del virus del chikungunya en Colombia: evidencia de selección purificadora en el gen <i>E1</i> <i>Katherine Laiton-Donato, José A. Usme-Ciro, Angélica Rico, Lissethe Pardo, Camilo Martínez, Daniela Salas, Susanne Ardila, Andrés Páez</i>	25
Diagnóstico diferencial de dengue y chikungunya en pacientes pediátricos <i>Eliana Patricia Calvo, Carolina Coronel-Ruiz, Syrley Velazco, Myriam Velandia-Romero, Jaime E. Castellanos</i>	35
Análisis exploratorio de ondulaciones de los patrones de estacionalidad del dengue en Colombia <i>Julián Alfredo Fernández-Niño, Luz Mery Cárdenas-Cárdenas, Juan Eugenio Hernández-Ávila, Lina Sofía Palacio-Mejía, Carlos Andrés Castañeda-Orjuela</i>	44
Priorización de enfermedades virales zoonóticas en la interfaz de cerdos silvestres, cerdos domésticos y seres humanos <i>Diana Benavides-Arias, Diego Soler-Tovar</i>	56
Infección simultánea por el virus de la hepatitis E y de otras hepatitis virales en Colombia y su caracterización genotípica <i>Dioselina Peláez, Daniel Martínez-Vargas, Martha Escalante-Mora, Mariel Palacios-Vivero, Lady Contreras-Gómez</i>	69
Análisis de genotipos del virus de la hepatitis B mediante el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción <i>Julio-C Rendón, Fabián Cortés-Mancera, Alejandra Duque-Jaramillo, Marta C. Ospina, María-Cristina Navas</i>	79
Caracterización del estado de salud de las personas en su periodo de convalecencia de un episodio de dengue <i>Laura Lizeth Luengas, Diana Carolina Tíga, Víctor Mauricio Herrera, Luis Ángel Villar-Centeno</i>	89
Metodología para la elaboración de canales endémicos y tendencia de la notificación del dengue, Valle del Cauca, Colombia, 2009-2013 <i>Mauricio Hernández, Diana Arboleda, Stephania Arce, Allan Benavides, Paola Andrea Tejada, Sindy Vanessa Ramírez, Ángela Cubides</i>	98
Seroprevalencia del virus linfotrópico humano de tipos I y II en donantes del Banco de Sangre de la Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia, 2008-2014	

<i>Carmenza Macía, Sandra Vargas, Ana María Mora, Ashly Melissa Sarmiento, Robinson Pacheco, Fernando Rosso</i>	108
Distribución geográfica del mono aullador rojo (<i>Alouatta seniculus</i>) y la fiebre amarilla en Colombia <i>Juan Piedrahita-Cortés, Diego Soler-Tovar</i>	116
Comportamiento de la mortalidad por dengue en Colombia entre 1985 y 2012 <i>Pablo Chaparro-Narváez, Willian León-Quevedo, Carlos Andrés Castañeda-Orjuela</i>	125
Evidencia de circulación del virus de la hepatitis A, subgenotipo IA, en muestras ambientales en Antioquia, Colombia <i>Paula Andrea Báez, Carlos Mario Jaramillo, Lina Arismendi, Julio César Rendón, Fabián Cortés-Mancera, Dioselina Peláez, María Mercedes González, Francisco Molina, María Cristina Navas</i>	135
Reguladores de integridad endotelial como posibles predictores de la gravedad en casos de dengue <i>Claudia Lucía Figueroa, Margarita Gélvez, Jürg Niederbacher</i>	148
La infección con el virus del dengue induce apoptosis en células del neuroblastoma humano SH-SY5Y <i>Jaime E. Castellanos, José I. Neissa, Sigrid J. Camacho</i>	156
Presencia de virus entéricos en muestras de agua para el consumo humano en Colombia: desafíos de los sistemas de abastecimiento <i>Dioselina Peláez, Blanca Lisseth Guzmán, Johanna Rodríguez, Felipe Acero, Gerardo Nava</i>	169
Prevalencia y curso clínico de la infección por dengue en adultos mayores con cuadro febril agudo en un hospital de alta complejidad en Cali, Colombia <i>Fernando Rosso, Sara Vanegas, Sarita Rodríguez, Robinson Pacheco</i>	179
Seroprevalencia de citomegalovirus en donantes de órganos y receptores de trasplante renal, Colombia, 2010-2014 <i>Yazmín Rocío Arias-Murillo, Karime Osorio-Arango, Jorge Alberto Cortés, Mauricio Beltrán</i>	187
Prevalencia de la infección con el virus linfotrópico de células T humanas de tipo 1 y 2 en donantes de sangre en Colombia, 2001-2014: implicaciones sobre la seguridad de la transfusión <i>María Isabel Bermúdez-Forero, Maritza Berrio-Pérez, Andrea Magally Herrera-Hernández, Magda Juliana Rodríguez-Rodríguez, Sandra García-Blanco, Guillermo Orjuela-Falla, Mauricio Beltrán</i>	194
Descarga de HSV-1, HSV-2, CMV y EBV en la saliva de receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos de la Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia, Bogotá, D. C. <i>Sonia P. Bohórquez, Juliana Díaz, Claudia M. Rincón, Marcela Estupiñán, Mauricio Chaparro, Ana María Low-Calle, Jaime E. Castellanos</i>	201
Carta al editor	211
Instrucciones a los autores	

Contents

Editorial

Virology, more necessary than ever <i>Jaime E. Castellanos</i>	5
---	---

Case presentation

Intracerebral hemorrhage caused by varicella-induced thrombocytopenia <i>Jairo Lizarazo, María Fernanda Castellanos, Claudia Rosa Omaña, Miguel Chaín, Sergio Villamizar</i>	10
--	----

Original articles

Genotyping, levels of expression and physical status of human papilloma virus in oropharyngeal squamous cell carcinoma among Colombian patients <i>Alveiro Erira, Leidy Angélica Motta, Andrés Chala, Andrey Moreno, Fredy Gamboa, Dabeiba Adriana García</i>	14
Phylogenetic analysis of Chikungunya virus in Colombia: Evidence of purifying selection in the E1 gene <i>Katherine Laiton-Donato, José A. Usme-Ciro, Angélica Rico, Lissethe Pardo, Camilo Martínez, Daniela Salas, Susanne Ardila, Andrés Páez</i>	25
Dengue and Chikungunya differential diagnosis in pediatric patients <i>Eliana Patricia Calvo, Carolina Coronel-Ruiz, Syrley Velazco, Myriam Velandia-Romero, Jaime E. Castellanos</i>	35
Exploratory wavelet analysis of dengue seasonal patterns in Colombia <i>Julián Alfredo Fernández-Niño, Luz Mery Cárdenas- Cárdenas, Juan Eugenio Hernández-Ávila, Lina Sofía Palacio-Mejía, Carlos Andrés Castañeda-Orjuela</i>	44
Prioritization of zoonotic viral diseases in feral pigs, domestic pigs and humans interface <i>Diana Benavides-Arias, Diego Soler-Tovar</i>	56
Coinfection of hepatitis E virus and other hepatitis virus in Colombia and its genotypic characterization <i>Dioselina Peláez, Daniel Martínez-Vargas, Martha Escalante-Mora, Mariel Palacios-Vivero, Lady Contreras-Gómez</i>	69
Analysis of hepatitis B virus genotypes by restriction fragment length polymorphism <i>Julio C. Rendón, Fabián Cortés-Mancera, Alejandra Duque-Jaramillo, Marta C. Ospina, María Cristina Navas</i>	79
Characterization of the health condition of people convalescing from a dengue episode <i>Laura Lizeth Luengas, Diana Carolina Tiga, Víctor Mauricio Herrera, Luis Ángel Villar-Centeno</i>	89
Methodology to develop endemic channels and notification trends for dengue in Valle del Cauca, Colombia, 2009-2013 <i>Mauricio Hernández, Diana Arboleda, Stephania Arce, Allan Benavides, Paola Andrea Tejada, Sindy Vanessa Ramírez, Ángela Cubides</i>	98

Seroprevalence of human T-lymphotropic virus in blood bank donors at Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia, 2008-2014 <i>Carmenza Macía, Sandra Vargas, Ana María Mora, Ashly Melissa Sarmiento, Robinson Pacheco, Fernando Rosso</i>	108
Geographical distribution of the red howler monkey (<i>Alouatta seniculus</i>) and yellow fever in Colombia <i>Juan Piedrahita-Cortés, Diego Soler-Tovar</i>	116
Dengue mortality in Colombia, 1985-2012 <i>Pablo Chaparro-Narváez, Willian León-Quevedo, Carlos Andrés Castañeda-Orjuela</i>	125
Evidence of the circulation of hepatitis A virus, subgenotype IA, in environmental samples from Antioquia, Colombia <i>Paula Andrea Báez, Carlos Mario Jaramillo, Lina Arismendi, Julio César Rendón, Fabián Cortés-Mancera, Dioselina Peláez, María Mercedes González, Francisco Molina, María Cristina Navas</i>	135
Regulators of endothelial integrity as severity predictors in dengue <i>Claudia Lucía Figueroa, Margarita Gélvez, Jürg Niederbacher</i>	148
Dengue virus induces apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells <i>Jaime E. Castellanos, José I. Neissa, Sigrid J. Camacho</i>	156
Presence of enteric viruses in water samples for consumption in Colombia: Challenges for supply systems <i>Dioselina Peláez, Blanca Liseth Guzmán, Johanna Rodríguez, Felipe Acero, Gerardo Nava</i>	169
Prevalence and clinical course of dengue infection in elderly patients with acute febrile illness in a tertiary care hospital in Cali, Colombia <i>Fernando Rosso, Sara Vanegas, Sarita Rodríguez, Robinson Pacheco</i>	179
Cytomegalovirus seroprevalence in organ donors and kidney transplant recipients, Colombia, 2010-2014 <i>Yazmín Rocío Arias-Murillo, Karime Osorio-Arango, Jorge Alberto Cortés, Mauricio Beltrán</i>	187
Prevalence of human T-cell lymphotropic virus I and II in Colombian blood donors, 2001-2014: Implications for transfusion safety <i>María Isabel Bermúdez-Forero, Maritza Berrío-Pérez, Andrea Magally Herrera-Hernández, Magda Juliana Rodríguez-Rodríguez, Sandra García-Blanco, Guillermo Orjuela-Falla, Mauricio Beltrán</i>	194
Shedding of HSV-1, HSV-2, CMV, and EBV in the saliva of hematopoietic stem cell transplant recipients at Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia, Bogotá, D.C. <i>Sonia P. Bohórquez, Juliana Díaz, Claudia M. Rincón, Marcela Estupiñán, Mauricio Chaparro, Ana María Low-Calle, Jaime E. Castellanos</i>	201
Letter to editor	211
Instructions for authors	

Editorial

La virología, más necesaria que nunca

Los microorganismos marinos aportan más de la mitad de la biomasa del mundo entero. Un mililitro de agua de mar contiene, aproximadamente, un millón de bacterias, mil protozoarios y hasta diez millones de virus. Estos últimos se encargan de infectar y eliminar gran parte de las bacterias e, incluso, animales y plantas, lo cual libera importantes cantidades de carbono y de subproductos, y contribuye a mantener el equilibrio de los océanos (1). En un estudio de secuenciación masiva de agua de diferentes mares del mundo, se reportó que más de 90 % del material genético presente no había sido identificado previamente, lo cual hace suponer que existen, al menos, 100.000 especies de virus que aún no se conocen (2).

Aunque anualmente se descubren varias decenas de virus en el mundo, los hallazgos en el campo de la virología médica no son tan frecuentes. Por ejemplo, las nuevas y poderosas herramientas bioinformáticas de secuenciación y análisis permitieron encontrar un nuevo virus en muestras de sangre de pacientes sometidos a transfusión, guardadas desde hace 40 años (3). Este nuevo virus (hepegivirus 1), con una secuencia similar a la del virus de la hepatitis C y a la del inocuo pegivirus, está siendo estudiado para indagar su potencial de transmisión y su patogenia. El mismo camino se recorrió cuando en el 2014 se descubrió un nuevo virus bacteriófago en la materia fecal humana, el cual se denominó crAssphage y que, al parecer, desempeña un papel importante en el control del crecimiento de las especies de Bacteroidetes del intestino (4). Lo extraño en este caso es que el ADN de la materia fecal humana se ha venido estudiando desde hace muchos años, pero solo hasta ahora, con el uso de las herramientas bioinformáticas, se logró la identificación de este fago. Estos casos nos advierten sobre las dificultades para entender la patogenia de las infecciones virales en los humanos.

El estudio de los virus ha marcado varios hitos en la ciencia. La variolización, el concepto de transmisión y la creación de la vacuna antirrábica, además de abrir las puertas de la virología y la inmunología, han cambiado el concepto de la humanidad sobre los virus y las enfermedades infecciosas. Otros casos de interés han sido el descubrimiento del virus de la fiebre amarilla, la vacuna contra la poliomielitis, el conocimiento de las secuelas congénitas de la rubéola, el papel del virus del papiloma humano en el cáncer de cuello uterino y la aparición del virus de la inmunodeficiencia humana.

Es común escuchar exclamaciones temerosas sobre las nuevas enfermedades que aparecen cada día. Es la sensación cierta de que algo ha cambiado en el mundo y que ya no se está seguro en ningún lugar del planeta. Si bien muchas de estas enfermedades infecciosas no son nuevas, sí lo son las conexiones entre los países, la velocidad de la dispersión y la mayor seriedad e impacto de las infecciones. Los cambios económicos y culturales actuales potencian los factores de riesgo para la dispersión de nuevos virus y bacterias. Por ejemplo, la urbanización desordenada, el déficit en el acceso a agua potable, alcantarillado y saneamiento básico, el transporte aéreo masivo, la invasión de nuevos hábitats en selvas y bosques, los nuevos vectores y el cambio climático han contribuido a la aparición o el recrudecimiento en la circulación de agentes patógenos que no conocen fronteras, verdaderas 'bombas sanitarias' cuya importancia es cada vez mayor (5).

Las enfermedades virales emergentes, el fin de la tranquila certidumbre

Las tres cuartas partes de las enfermedades emergentes en humanos han tenido su origen en animales (por ejemplo, HIV, influenza, zika, rabia, etc.). En general, las infecciones virales causan anualmente más de dos millones de fallecimientos en el mundo, y más de 1,2 millones de muertes se deben al sida, principalmente en los países subdesarrollados (6). A este número se deben sumar las cifras de fallecidos

por infecciones virales tropicales, como el ébola, el dengue, el chikungunya, la fiebre del Nilo y ahora el zika, que tienen un impacto negativo en el desarrollo de los países afectados. Las crisis sanitarias recientes causadas por los coronavirus (CoV) del síndrome agudo respiratorio grave (CoV-SARS) en el 2003 y del síndrome respiratorio del Medio Oriente (CoV-MERS) en el 2012, la pandemia de influenza H1N1 en el 2009 y los arbovirus chikungunya y zika, se han visto como verdaderas amenazas para el planeta entero. El aumento explosivo de viajes comerciales y turísticos, la desigualdad y la pobreza, la migración por violencia, hambrunas o sequías y el cambio climático explican en parte la reaparición de virus antiguos y la aparición de nuevos agentes. En cuanto al efecto en la economía, se estima que una pandemia causada por virus podría tener efectos sociales y económicos muy significativos, reduciendo en por lo menos el 5 % el producto mundial (7).

Entre 1940 y 2004 han aparecido 84 virus causantes de brotes o epidemias (8), y se han determinado los factores de mayor incidencia en la aparición de dichas infecciones, a saber:

- i) el cambio del uso de la tierra, especialmente la colonización de selvas y regiones previamente inexploradas con fines agrícolas;
- ii) los cambios demográficos o en los hábitos sociales y personales de los individuos, los cuales profundizan las condiciones sanitarias precarias;
- iii) la evolución genética de los agentes patógenos, su mayor virulencia y resistencia a fármacos;
- iv) el intercambio masivo de personas y mercancías entre países;
- v) la debilidad de los sistemas de salud y de vigilancia en los países subdesarrollados, y
- vi) el cambio climático y el aumento en la temperatura global, que favorecen la propagación de insectos vectores.

Se prevén nuevos brotes de infecciones por virus emergentes en las próximas dos décadas en las megaciudades ubicadas en zonas de gran biodiversidad, y en zonas de fauna y flora selvática, como las colombianas, en donde los virus han demostrado una gran capacidad de recombinación genética o saltos antigénicos. De ahondarse la inadecuada situación sanitaria en estas ciudades, la transmisión de estos virus también se potenciará, facilitando un nicho para la replicación y dispersión explosiva de nuevos agentes patógenos. En este sentido, la deforestación acelerada de las selvas americanas, asiáticas y africanas ha favorecido el contacto con arbovirus que se habían mantenido aislados, como el zika y el chikungunya; se sabe que el contacto con primates fue el origen de la transmisión del HIV y del ébola. La invasión de las selvas y bosques también conduce al desplazamiento de roedores y murciélagos, lo cual aumenta la frecuencia de contacto con virus desconocidos para el hombre (9).

Algunos ejemplos de casos de virosis emergentes

En una época en la cual cualquier punto del mundo se puede contactar con el extremo opuesto en menos de 24 horas, la dispersión de un virus y la aparición de una epidemia son casi automáticas, como quedó demostrado con las recientes epidemias de chikungunya y zika en América. En lugar de reducirse, el fenómeno de dispersión global será cada vez más importante en la aparición y reaparición de virosis, como en el caso del virus del Nilo occidental (WNV), el cual causó varios brotes en Egipto en los años 50 y fue introducido por un viajero en 1999 directamente desde Israel a Nueva York, causando un brote de casos fatales de encefalitis (10).

El WNV tiene reservorios en aves, algunas de ellas migratorias, que pueden viajar miles de kilómetros y depositarlo en zonas en donde circula el mosquito encargado de transmitirlo a caballos y a humanos. En Colombia, hay evidencia desde el 2005 sobre la infección con WNV en el suero de caballos (11) y, más recientemente, se lo encontró en mosquitos de la Costa Caribe colombiana (12), aunque, afortunadamente, del genotipo atenuado, el cual se asocia con baja incidencia de casos neurológicos. Sin embargo, la amenaza sigue latente.

Por otro lado, los cambios en los sistemas de producción animal también han aportado su cuota en las epidemias emergentes. Se recuerda bien el caso de las grandes empresas avícolas en China, en donde en los últimos 15 años aparecieron varios virus muy patógenos de influenza aviar (H5N1, H7N7, etc.), los

cuales han causado más de 850 casos en el mundo, con una tasa de fallecimientos de más del 50 %, y se consideran como la más inminente amenaza de pandemia (13). Un camino similar siguió la epidemia de influenza A H1N1 en el 2009, la cual se originó en cerdos de Estados Unidos y fue dispersada por los trabajadores mexicanos que laboraban en las granjas.

En cuanto al CoV-SARS, hoy se sabe que su reservorio asintomático son los murciélagos del área de Guangdong (China), pero que pueden contagiar civetas, mamíferos similares al mapache que se venden vivos en los mercados para su consumo (14). Por esta razón, los primeros casos ocurrieron entre individuos de la plaza de mercado de esta ciudad que manipularon la carne de las civetas y transmitieron el virus a otras personas, provocando más de 8.000 casos en 28 países, de los cuales 815 fueron fatales. En el control de ese brote se invirtieron más de €70.000 millones (15), y se estima que una pandemia similar por un virus con un mayor índice de contagio podría multiplicar dicha cifra por 100.

El CoV-MERS, un coronavirus similar, tuvo su origen también en murciélagos que contagiaron camellos, los que a su vez contagiaron a sus jinetes en los países árabes (16). Los primeros casos en humanos se detectaron en Arabia Saudita en el 2012, con una tasa de mortalidad del 36 %. Debido a que el virus todavía no tiene la capacidad de transmitirse eficientemente entre humanos, el número de casos es bajo, pues se han confirmado 1.733 casos, pero 628 de ellos fueron fatales.

Desde finales del 2015 hasta el primer semestre de 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó un brote de virus de fiebre amarilla (YFV) en Angola, suroccidente de África, con 3.682 casos confirmados y 361 fallecidos, principalmente en Luanda, la capital, y se reportaron 1.798 casos relacionados con este mismo brote en la vecina República Democrática del Congo, 85 de los cuales fueron fatales (17). Además, se detectaron nueve casos de individuos de nacionalidad china que se contagiaron en Angola y desarrollaron la enfermedad a su regreso a China. Esta situación es muy preocupante, ya que, además de evidenciar la circulación urbana del YFV y su adaptación a mosquitos domésticos, demuestra una aberrante situación de escasez de vacuna, la cual se ha dejado de producir en muchos países, entre ellos Colombia.

Después de la experiencia de la transmisión transoceánica del CHIKV y el ZIKV, no es impensable que pueda darse la transmisión de fiebre amarilla urbana en América a partir de un virus importado, ya que el mosquito vector, *Aedes aegypti*, es el mismo para estos arbovirus. Debemos recordar que, aproximadamente, el 15 % de los casos de infección por el YFV son fatales y, como lo demuestran los casos en Kinshasa, capital de la República Democrática del Congo, cuando existen las condiciones para la transmisión del dengue, es muy fácil que comience la transmisión autóctona del virus de fiebre amarilla. Este es un llamado de alerta para las ciudades latinoamericanas.

El caso del dengue

El dengue es la virosis transmitida por insectos de mayor impacto en el mundo, y su distribución ha sido la más acelerada en los últimos 30 años. Causa casi 400 millones de infecciones y, por lo menos, 50.000 muertes por año, con gran impacto en la economía de los países en los que el virus circula (18). La carga económica de la enfermedad puede ser de alrededor de USD\$ 100 millones por cada 10.000 casos. En Colombia, se calculó que la epidemia del 2010 le costó al país más de COP\$ 600.000 millones (¡más de medio billón!), incluidos los costos directos, los costos médicos indirectos cubiertos por los pacientes, los costos de las campañas del Estado y los costos sociales (días de incapacidad, ausentismo escolar y laboral), así como el costo de la pérdida de ingresos por las muertes prematuras (19). Aunque las cifras en los años endémicos no son tan altas, sí demuestran que es un problema que afecta gravemente el desarrollo global de nuestro país.

Para enfrentar el dengue, la comunidad científica en Colombia ha asumido el reto de profundizar en los factores biológicos determinantes del virus y de los individuos, y en los factores entomológicos, sociales, culturales y políticos que no permiten que disminuya la cifra de personas afectadas por el dengue. En este contexto, vale la pena resaltar que el colombiano Luis Ángel Villar, de la Universidad Industrial de Santander, un “dengólogo” de amplia experiencia, ha sido uno de los responsables de los estudios de fase III de una vacuna recientemente recomendada por la OMS para su uso en zonas endémicas (20).

Papel de la virología en la investigación de las enfermedades emergentes

Los expertos en infecciones virales en Colombia contribuyen permanentemente a responder preguntas relacionadas con la emergencia de infecciones, muestra de lo cual es la publicación de más de 100 artículos al año sobre temas relacionados (21), por ejemplo, la descripción cada vez más profunda de los agentes patógenos existentes y de otros nuevos, el estudio de la evolución viral hacia una mayor virulencia, de la forma en que los viajes locales o internacionales y el comercio mundial afectan la dispersión de los virus, así como de los casos en los que los virus cruzan las barreras de las especies. Además, la relevancia creciente de las infecciones virales en veterinaria, dado su impacto en la producción pecuaria y en la convivencia con mascotas, merece especial atención.

Hoy también compete a la virología el estudio de los contactos cada vez más frecuentes y prolongados con los vectores e, incluso, la estimación de los gastos en que incurren los países en la atención de las enfermedades virales. No se trata solo de los costos económicos, pues las epidemias, además de afectar la calidad de vida de los pueblos, inciden negativamente en los índices de escolarización, las tasas de deserción escolar y la productividad de las sociedades, generando hasta el 2 % de pérdida del crecimiento del PIB en los países subdesarrollados (22).

El papel de los científicos en este panorama ha sido importante, y se ha visto potenciado por el acceso a más y mejores técnicas de secuenciación de ADN y ARN, por el intercambio inmediato de datos desde cualquier lugar del mundo, así como por el intercambio de reactivos y de cepas virales, y los llamados de los gobiernos a profundizar en el estudio de los nuevos virus y de la forma de enfrentarlos (23). También hay factores que dificultan el proceso, como la legislación cada vez más estricta para el transporte de muestras biológicas entre países, las leyes de protección ambiental, la reglamentación sobre la experimentación en animales y los costos de las investigaciones en seres humanos.

Mensaje para la reflexión

Para este número especial de *Biomédica* sobre enfermedades virales, se recibieron más de medio centenar de propuestas y hoy se publican los resultados de varios estudios de investigadores colombianos en diferentes áreas: las descripciones clínicas (varicela, dengue), la epidemiología molecular (CHIKV, HPV), la epidemiología y la patogenia del dengue y la hepatitis, la detección de virus ambientales (HAV, enterovirus, reservorios de YFV), la seroprevalencia del HTLV y las zoonosis virales. Se demuestra, así, la permanente actividad de los investigadores en el campo de la virología en el país y su deseo de aportar a las diferentes áreas de esta disciplina.

La contribución de los científicos debe ayudar a tomar decisiones para el control de los factores que causan la aparición, la reaparición y la propagación de las infecciones virales, tales como la urbanización desordenada, el intercambio de bienes y personas, el uso inadecuado de las tierras, el desplazamiento de poblaciones y las técnicas pecuarias inadecuadas. Es claro que los llamamientos de las organizaciones internacionales o de los centros de investigación mundial en torno a la definición de las prioridades de investigación pueden ayudar a orientar la distribución de los recursos por parte de las agencias financiadoras. La nueva realidad de las enfermedades emergentes impone la colaboración entre los países desarrollados y aquellos que padecen la aparición de las enfermedades, potenciando la cooperación descentralizada y favoreciendo el intercambio de técnicas, protocolos, reactivos e, incluso, cepas de los agentes patógenos de interés.

Dado que la amenaza de nuevos agentes patógenos surge principalmente del contacto de los humanos con aquellos presentes en las zonas selváticas aisladas, se requiere una estrategia que permita detectar tempranamente las epidemias. El sistema de detección, identificación y vigilancia establecido para enfrentar la influenza A H5N1 se vio sobrepasado por la aparición de un virus nuevo, con un huésped diferente y en un lugar geográfico insospechado (Flu A H1N1, 2009), lo cual deja entrever la dificultad de la tarea.

La obtención de mayores recursos para la investigación básica y aplicada sobre los factores determinantes biológicos o sociales de las enfermedades virales, no es solo un asunto de supervivencia académica para los virólogos, sino también de supervivencia de la humanidad. Tenemos el gran reto de seguir avanzando.

Jaime E. Castellanos

Grupo de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

Referencias

1. **Suttle CA.** Marine viruses, major players in the global ecosystem. *Nature Rev Microbiol* 2007;5:801-12. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1750>
2. **Angly F, Felts B, Breitbart M, Salamon P, Edwards R, Carlson C, et al.** The marine viromes of four oceanic regions. *PLoS Biology* 2006;4:e-368. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0040368>
3. **Kapoor A, Kumar A, Simmonds P, Bhuva N, Chauhan L, Lee B, et al.** Virome analysis of transfusion recipients reveals a novel human virus that shares genomic features with hepaciviruses and pegiviruses. *mBio* 2015;6:e01466-15. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01466-15>
4. **Dutilh BE, Cassman N, McNair K, Sánchez SE, Silva GGZ, Boling L, et al.** A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat Commun.* 2014;5:4498. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5498>.
5. **McMichael AJ.** Environmental and social influences on emerging infectious diseases: Past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004;359:1049-58. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2004.1480>
6. **Center for Statagic & International Studies.** Infectious diseases, a persistent threat. Fecha de consulta: 31 de mayo de 2016. Disponible en: <http://www.smartglobalhealth.org/issues/entry/infectious-diseases>
7. **Bloom DE, Canning D.** Epidemics and economics. Cambridge: Harvard School of Public Health; 2006. Fecha de consulta: 31 de mayo de 2016. Disponible en: https://www.hsph.harvard.edu/program-on-the-global-demography-of-aging/WorkingPapers/2006/BLOOM_CANNINGWP9.2006.pdf
8. **Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al.** Global trends in emerging infectious diseases. *Nature.* 2008;451:990-3. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06536>.
9. **Luis AD, Hayman DTS, O'Shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, Pulliam JR, et al.** A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: Are bats special? *Proc Biol Sci.* 2013;280:20122753. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2012.2753>
10. **Sejvar JJ.** West Nile Virus: A historical overview. *Ochsner J.* 2003;5:6-10.
11. **Mattar S, Edwards E, Laguado J, González M, Álvarez J, Komar N.** West Nile virus antibodies in Colombian horses. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1497-8. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1109.050426>
12. **Hoyos-López R, Uribe-Soto S, Gallego-Gómez JC.** Evolutionary relationships of West Nile virus detected in mosquitoes from a migratory bird zone of Colombian Caribbean. *Vírol J.* 2015;12:80. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0310-8>
13. **Uyeki TM.** Human infection with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus: Review of clinical issues. *Clin Infect Dis.* 2009;49:279-90. <http://dx.doi.org/10.1086/600035>
14. **Cheng VC, Lau SK, Woo PC, Yuen KY.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:660-94. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00023-07>
15. **Knobler S, Mahmoud A, Lemon S, Mack A, Sivitz L, Oberholtzer K.** The impact of the SARS epidemic. In: Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats. Learning from SARS: Preparing for the next disease outbreak. Workshop Summary. Washington, D. C.: National Academies Press; 2004. Fecha de consulta: 31 de mayo de 2016. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92486>
16. **Azhar EI, El-Kafrawy SA, Farraj SA, Hassan AM, Al-Saeed MS, Hashem AM, et al.** Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. *N Engl J Med.* 2014;370:2499-505. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1401505>
17. **World Health Organization.** Yellow fever situation report. Fecha de consulta: 21 de julio de 2016. Disponible en: <http://www.who.int/emergencies/yellow-fever/situation-reports/21-july-2016/en/>
18. **Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al.** The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496:504-7. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12060>
19. **Castro-Rodríguez R, Carrasquilla G, Porras A, Galera-Gelvez K, López- Yescas JG, Rueda-Gallardo JA.** Burden of dengue and the financial cost to Colombia, 2010-2012. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94:1065-72. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.15-0280>
20. **Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, et al.** Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med.* 2015;372:113-23. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1411037>
21. **Ruiz-Sáenz J, Martínez-Gutiérrez M.** Virology research in a Latin American developing country: A bibliometric analysis of virology in Colombia (2000-2013). *J Infect Dev Ctries.* 2015;9:1226-37. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.6627>
22. **Fonkwo PN.** Pricing infectious disease: The economic and health implications of infectious diseases. *EMBO Rep.* 2008;9 (Suppl.1):S13-7. <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2008.110>
23. **Imperiale MJ, Casadevall A.** The importance of virology at a time of great need and great jeopardy. *mBio* 2015;6:e00236. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00236-15>

PRESENTACIÓN DE CASO

Hemorragia cerebral secundaria a trombocitopenia por varicela

Jairo Lizarazo¹, María Fernanda Castellanos², Claudia Rosa Omaña¹,
Miguel Chaín¹, Sergio Villamizar¹

¹ Departamento de Medicina Interna, Hospital Universitario Erasmo Meoz, Cúcuta, Colombia

² Facultad de Salud, Universidad de Pamplona, Pamplona, Norte de Santander, Colombia

Se presenta el caso de un hombre de 44 años, previamente sano, con varicela, trombocitopenia grave, manifestaciones hemorrágicas en mucosas y una extensa hemorragia cerebral en el hemisferio derecho. Su tratamiento incluyó la transfusión de plaquetas y altas dosis de esteroides. El paciente mejoró, aunque persistieron la hemianopsia homónima izquierda y la epilepsia, tratada con medicación.

Palabras clave: hemorragia cerebral, trombocitopenia, varicela, adulto.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2917>

Intracerebral hemorrhage caused by varicella-induced thrombocytopenia

We present the case of a previously healthy 44-years-old man with chickenpox, severe thrombocytopenia, mucosal hemorrhage, and intracerebral hemorrhage in the right hemisphere. The patient was treated with platelets and high doses of steroids. He recovered although with persistent left homonymous hemianopsia and epilepsy, which were controlled with medication.

Key words: Cerebral hemorrhage, thrombocytopenia, chickenpox, adult.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2917>

La varicela es una enfermedad común en la infancia y usualmente benigna, que es causada por el virus varicela-zóster y se caracteriza por la presencia de fiebre y exantema vesicular (1). En adultos, la varicela es menos frecuente, pero tiende a ser más grave y frecuentemente se asocia con complicaciones (2). La trombocitopenia es común en la varicela en todas las edades (2), sin embargo, las complicaciones hemorrágicas cerebrales son muy raras (3).

Se presenta el caso de un hombre adulto con varicela complicada por una trombocitopenia extrema que le produjo una hemorragia cerebral masiva.

Caso clínico

Se trata de un agricultor de 44 años de edad previamente sano, procedente de Cúcuta y consumidor frecuente de bebidas alcohólicas durante los 25 años previos.

Correspondencia:

Jairo Lizarazo, Calle 13 N° 1E-44, consultorio 404B, Cúcuta, Colombia

Teléfono: 572 2635

jflizar@gmail.com

Recibido: 27/07/15; aceptado: 16/02/16

En las tres semanas anteriores, su esposa y sus dos hijas habían presentado varicela. Ingresó al Servicio de Urgencias del Hospital Universitario Erasmo Meoz de Cúcuta el 17 de marzo de 2014, debido a un cuadro clínico de 12 días de evolución, caracterizado por fiebre no cuantificada en los primeros tres días, acompañada de escalofríos, mialgias, artralgias, cefalea global con intensidad de 7 sobre 10 en la escala subjetiva de dolor, y la aparición al tercer día de un exantema generalizado con pápulas vesiculosas y costras a partir del sexto día, con epistaxis abundante y hematuria; en el décimo día presentó hemoptisis, hematemesis y melenas, por lo cual asistió a consulta ambulatoria y se le prescribió acetaminofén. En las 24 horas previas al ingreso sufrió tres episodios convulsivos generalizados descritos como tónico-clónicos y pérdida transitoria de la conciencia. En el momento del ingreso al hospital presentó el resultado de un examen de laboratorio en el cual el recuento manual de plaquetas era de 13.000/ μ l.

En el examen físico el paciente estaba alerta, deshidratado y pálido; su tensión arterial sistémica era de 163/84 mm Hg, la frecuencia cardíaca de 68 latidos por minuto, la frecuencia respiratoria

Contribución de los autores:

Jairo Lizarazo y María Fernanda Castellanos: manejo del paciente y escritura del artículo
Claudia Rosa Omaña, Miguel Chaín y Sergio Villamizar: manejo del paciente

de 22 respiraciones por minuto, la temperatura de 37 °C y la saturación de oxígeno de 98 % sin suplemento de oxígeno. Presentaba numerosas lesiones costrosas en el tronco, las extremidades y la cabeza, y había hemorragias en el paladar, en la base de la lengua y en la conjuntiva del ojo derecho (figura 1 A y B). En el examen neurológico se registró un puntaje de 13 sobre 15 en la escala de coma de Glasgow (O3V4M6), ligera confusión mental, lenguaje fluido, hemianopsia homónima izquierda y hemiparesia flácida izquierda (4/5), con respuesta plantar neutra. Se comprobó hematuria mediante el uso de una sonda vesical.

En el cuadro hemático automatizado de ingreso se encontró una leve anemia normocítica y normocrómica (hemoglobina de 11,8 g/dl), leucocitosis leve con neutrofilia y ausencia de plaquetas, lo cual se confirmó mediante el recuento manual de plaquetas. Las pruebas de química sanguínea, los electrolitos séricos y la radiografía del tórax fueron normales, y la prueba para HIV no fue reactiva.

En la tomografía computarizada (TC) de cráneo se evidenció una hemorragia cerebral en los lóbulos temporal, parietal y occipital derechos, con un volumen aproximado de 33 ml determinado por el método ABC/2 (4), con edema perilesional, efecto de masa debido al colapso del atrio ventricular derecho y desviación de la línea media, además de drenaje hemático hacia el atrio ventricular izquierdo.

El paciente fue valorado por el neurocirujano, quien planteó someterlo a una cirugía de drenaje, la cual no fue aceptada por la familia. La trombocitopenia se trató con 10 unidades de plaquetas y 500 mg intravenosos de metilprednisolona cada 12 horas durante tres días, y luego se continuó con 70 mg de prednisona diarios por vía oral.

El 18 de marzo de 2014, el paciente presentó episodios de hematemesis y fue trasladado a la unidad de cuidados intermedios en espera del traslado a la de cuidados intensivos, el cual se hizo el 22 de marzo siguiente. Durante su estancia no hubo mayor deterioro neurológico, pero su tensión arterial sistémica permaneció alta, por lo cual recibió amlodipino. En la TC de cráneo que se le tomó el 20 de marzo (figura 2A) se observó que el volumen de la hemorragia cerebral había aumentado a 58,5 ml. Las plaquetas fueron indetectables durante aproximadamente 24 horas y empezaron a aumentar en forma paulatina hasta llegar a los valores normales el 22 de marzo (cuadro 1).

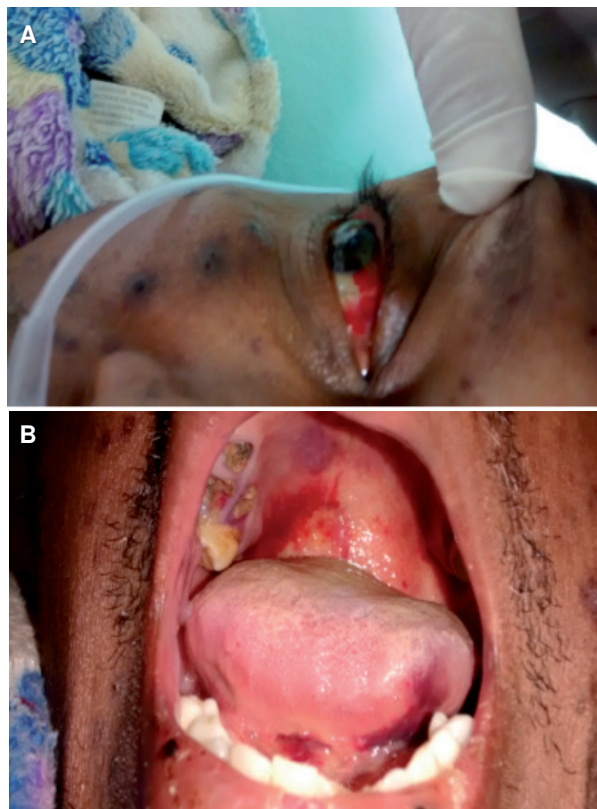


Figura 1. A. Hemorragia conjuntival y exantema costroso en la cara. **B.** Hemorragia en paladar y lengua.

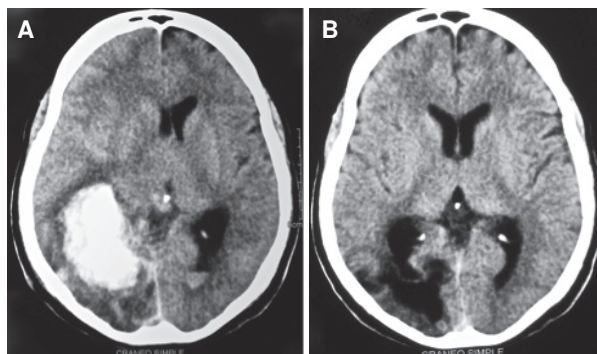
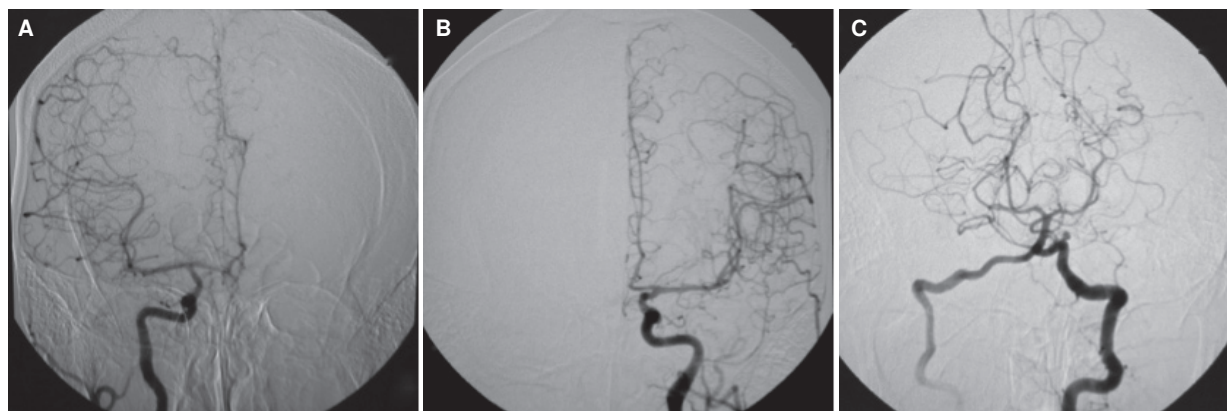


Figura 2. Tomografía computarizada de cráneo: A. (20/3/14) hemorragia cerebral en los lóbulos temporal, parietal y occipital derechos, con edema perilesional, efecto de masa sobre el atrio ventricular del mismo lado, desviación de la línea media y drenaje hemático en el atrio ventricular izquierdo; **B.** (17/7/14) extensa encefalomalacia en la misma localización, con dilatación compensatoria del atrio ventricular ipsilateral.

El paciente continuó estable y fue trasladado a la sala general dada su mejoría parcial. La panangiografía cerebral del 3 de abril de 2014 fue normal (figura 3) y, en el momento del egreso, el paciente tenía un puntaje de 15 sobre 15 en la

Cuadro 1. Conteo de plaquetas durante la evolución de la trombocitopenia

Fecha y hora	17/3/14 12:55 h.	17/3/14 19:02 h.	17/3/14 22:32 h.	18/03/14 18:04 h.	19/3/14 9:57 h.	20/3/14 6:15 h.	21/3/14 6:24 h.	22/3/14 05:51 h.
Número de plaquetas/ μ l	13.600	0,0 (0 manual)	0,0	0,0	3.000 (5.000 manual)	44.000	138.000	275.000

**Figura 3.** Panangiografía cerebral con hallazgos normales: **A.** Carótida interna derecha; **B.** Carótida interna izquierda; **C.** Arterias vertebrales y tronco basilar

escala de coma de Glasgow, así como hemianopsia homónima e inatención visual en el lado izquierdo, comprobadas por la ausencia de reacción ante la estimulación táctil y auditiva. El tratamiento con esteroides se suspendió sin complicaciones.

En los meses posteriores, el paciente se siguió atendiendo por consulta externa y en ese lapso presentó varias crisis convulsivas tónico-clónicas debido a la suspensión del medicamento anti-convulsivo, las cuales se trataron con 300 mg diarios de fenitoína sódica por vía oral, así como una infección por el virus de chikunguña. En la TC de cráneo tomada el 17 de julio de 2014 (figura 2B) se observó que la hemorragia cerebral había cedido su lugar a una extensa área con encefalomalacia en los lóbulos temporal, parietal y occipital derechos, y dilatación compensatoria del atrio ventricular del mismo lado; un año después la hemianopsia homónima izquierda persistía.

Discusión

La trombocitopenia es frecuente durante la varicela, aunque rara vez con manifestaciones hemorrágicas (2). En adultos y en niños se ha registrado una prevalencia entre 22 y 42,1 % (1-3). La trombocitopenia se desarrolla usualmente en forma temprana en el curso de la enfermedad, pero la muerte por hemorragia cerebral asociada a trombocitopenia aguda por varicela es

extremadamente rara. En una revisión de Pubmed de los últimos 50 años, solo se encontraron dos casos en niños (5,6), en uno de los cuales el número de plaquetas fue de 4.000/dl (6). También, se ha descrito púrpura trombocitopénica posterior a la varicela con una incidencia de 1,1% en niños hospitalizados (7).

La trombocitopenia durante la infección por varicela se debe probablemente al mimetismo molecular entre el antígeno viral y las glucoproteínas de la superficie de las plaquetas, lo que causa una reacción cruzada entre los anticuerpos del huésped y los antígenos de la membrana de las plaquetas, con la consecuente destrucción de estas (6). De hecho, en varios estudios se ha demostrado la presencia de anticuerpos antiplaquetarios en la infección por el virus varicela-zóster, la mayoría del tipo IgM, que se dirigen contra las glucoproteínas de superficie plaquetaria Ib, IIb, V y IIIa (8), lo cual puede deberse a la pérdida de la regulación por parte del sistema inmunológico sobre los clones de linfocitos 'autorreactivos' que circulan en la sangre periférica y depende de las características inmunológicas y genéticas del enfermo (8).

Teniendo en cuenta este mecanismo patógeno autoinmunitario, en el presente caso se utilizaron altas dosis de esteroides, con una buena reacción a los dos días. Sin embargo, no hay estudios con

controles, únicamente informes de casos pediátricos, que respalden el uso de este tratamiento (9). En otros reportes se señala el uso de la inmunoglobulina estándar (10).

La observación de casos potencialmente fatales, como el de este informe, puede reforzar los argumentos a favor de la prevención mediante la vacunación contra la varicela en los niños.

Agradecimientos

A Elizabeth Castañeda por su revisión crítica del manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores no tenemos conflicto de intereses.

Financiación

En la realización de este estudio se utilizaron recursos del Hospital Universitario Erasmo Meoz de Cúcuta.

Referencias

1. **Abro AH, Ustadi AM, Das K, Abdou AM, Hussaini HS, Chandra FS.** Chickenpox: Presentation and complications in adults. *J Pak Med Assoc.* 2009;59:828-31.
2. **Rivest P, Bédard L, Valiquette L, Mills E, Lebel MH, Lavoie G, et al.** Severe complications associated with varicella: Province of Quebec, April, 1994, to March, 1996. *Can J Infect Dis.* 2001;12:21-6.
3. **Ali N, Anwar M, Majeed I, Tariq Wu.** Chicken pox associated thrombocytopenia in adults. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2006;16:270-2.
4. **Kothari RU, Brott T, Broderick JP, Barsan WG, Sauerbeck LR, Zuccarello M, et al.** The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volumes. *Stroke.* 1996;27:1304-5. <http://dx.doi.org/10.1161/01.STR.27.8.1304>
5. **Tobin JD Jr, Ten Bense RW.** Varicella with thrombocytopenia causing fatal intracerebral hemorrhage. *Am J Dis Child.* 1972;124:577-8.
6. **Marcus KA, Halbertsma FJ, Ten WE.** Fatal intracerebral hemorrhage caused by varicella-induced thrombocytopenia. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26:1075. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e31815768f1>
7. **Amir A, Gilad O, Yacobovich J, Scheuerman O, Tamary H, Garty BZ.** Post-varicella thrombocytopenic purpura. *Acta Paediatr.* 2010;99:1385-8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.2010.01842.x>
8. **Montenegro-Medina YM, Rey-Caro LA, Niederbacher J, Martínez-Vega RA, Díaz-Quijano FA, Villar-Centeno LÁ.** Papel de los anticuerpos antiplaquetarios en la infección viral: una revisión sistemática de la literatura. *Biomédica.* 2011;31:35-43. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v31i1.334>
9. **Aji DY, Altinkaya N, Güler A, Ayhan YI, Erginel A, Cenani A.** The role of high-dose intravenous methylprednisolone in the treatment of varicella associated thrombocytopenic purpura. *Turk J Pediatr.* 1993;35:69-73.
10. **Large DM, Basu A, O'Brien H.** Intravenous gammaglobulin therapy in the thrombocytopenia of haemorrhagic varicella. *Postgrad Med J.* 1991;67:383-4.

ARTÍCULO ORIGINAL

Genotipificación, niveles de expresión y estado físico del virus del papiloma humano en pacientes colombianos con cáncer de células escamosas en la cavidad oral

Alveiro Erira¹, Leidy Angélica Motta¹, Andrés Chala², Andrey Moreno³,
Fredy Gamboa^{1,4}, Dabeiba Adriana García¹

¹ Centro de Investigaciones Odontológicas, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

² Facultad de Ciencias para la Salud, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia

³ Unidad de Cirugía de Cabeza y Cuello, Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Uno de los factores de riesgo del carcinoma de células escamosas en la cavidad oral es la infección por el virus del papiloma humano (HPV), cuyas prevalencias dependen de la región geográfica.

Objetivo. Identificar los tipos del virus del papiloma humano más frecuentes en el cáncer de la cavidad bucal, sus niveles de expresión y el estado físico del genoma viral.

Materiales y métodos. Se seleccionaron 46 pacientes que asistían a los servicios de cirugía de cabeza y cuello en Bogotá, Manizales y Bucaramanga. El examen histopatológico de las muestras incluidas en el estudio demostró la presencia de carcinoma de células escamosas en la cavidad oral en todas ellas. Se extrajo el ADN para genotipificar el virus y determinar el estado físico de su genoma, y el ARN para determinar los transcritos virales mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Resultados. La prevalencia del virus del papiloma humano en los tumores fue de 21,74% (n=10) y el tipo viral más frecuente fue el HPV-16 (nueve casos). La expresión viral del HPV-16 fue baja (una de 11 copias) y el estado físico predominante fue el mixto (ocho casos), con prevalencia de la disrupción en el sitio de unión de *E1* y *E2* (2525 a 3720 nucleótidos).

Conclusión. En los pacientes con carcinoma de cavidad oral incluidos en este trabajo, la frecuencia del virus del papiloma humano fue relativamente baja (21,7 %) y el tipo viral más frecuente fue el HPV-16, el cual se encontró en forma mixta y con baja expresión de *E7*, lo cual puede ser indicativo de un mal pronóstico para el paciente.

Palabras clave: papiloma, orofaringe, carcinoma, integración viral, proteínas oncogénicas, virus tumorales de ADN.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2912>

Genotyping, levels of expression and physical status of human papilloma virus in oropharyngeal squamous cell carcinoma among Colombian patients

Introduction: One of the risk factors for squamous cell oropharyngeal carcinoma is infection with the human papilloma virus (HPV), with prevalences that vary depending on the geographical region.

Objective: To identify the most frequent HPV viral types in oropharyngeal cancer, the levels of expression and the physical condition of the viral genome.

Materials and methods: Forty-six patients were included in the study from among those attending head and neck surgical services in the cities of Bogotá, Manizales and Bucaramanga. In the histopathological report all study samples were characterized as oropharyngeal squamous cell carcinoma. DNA extraction was subsequently performed for HPV genotyping and to determine the physical state of the viral genome, as well as RNA to determine viral transcripts using real-time PCR.

Contribución de los autores:

Alveiro Erira y Leidy Angélica Motta: desarrollo de los aspectos experimentales del estudio, apoyo en la estandarización de las técnicas utilizadas y en el análisis de los resultados

Fredy Gamboa: apoyo en el diseño experimental y el análisis de resultados

Andrés Chala y Andrey Moreno: participación en la selección de los casos incluidos en el estudio, toma de muestras y análisis de resultados

Dabeiba Adriana García: diseño del estudio, coordinación de los aspectos experimentales y participación en el análisis de resultados

Todos los autores participaron en la preparación y la revisión del manuscrito.

Results: HPV prevalence in tumors was 21.74% (n=10) and the most common viral type was HPV-16 (nine cases). Viral expression for HPV-16 was low (one of 11 copies) and the predominant physical state of the virus was mixed (eight cases), with disruption observed at the *E1* - *E2* binding site (2525 – 3720 nucleotides).

Conclusion: The prevalence of HPV associated with oropharyngeal carcinoma among the Colombian study population was 21.7%, which is relatively low. The most frequent viral type was HPV-16, found in a mixed form and with low expression of *E7*, possibly indicating a poor prognosis for these patients.

Key words: Papiloma, oropharynx, carcinoma, virus integration, oncogene proteins, DNA tumor viruses.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2912>

El carcinoma de células escamosas representa más de 90 % de todos los tumores malignos de la cavidad oral (1), la cual tiene un epitelio poliestratificado de tipo escamoso no 'queratinizado' y constituye una parte integral de las vías superiores respiratorias y digestivas (2).

En el 2008 se reportaron en el mundo 85.000 nuevos casos de este carcinoma, de los cuales más de tres cuartas partes se presentaron en hombres (3). En el 2012 se reportó un incremento en la incidencia de este cáncer en Estados Unidos, atribuido principalmente a la infección por el virus del papiloma humano (HPV). La incidencia del cáncer de células escamosas en la cavidad oral asociado a este virus aumentó de 0,8 a 2,6 por cada 100.000 habitantes entre 1988 y 2004, mientras que los pacientes negativos para la infección por este virus disminuyeron de 2,0 a 1 por cada 100.000 habitantes (4).

En algunos estudios en Colombia se ha reportado una incidencia de cáncer de cabeza y cuello en hombres y mujeres de 1 y 0,3 por cada 100.000 habitantes respectivamente (5,6). Sin embargo, se desconoce la incidencia del HPV en el cáncer de células escamosas en la cavidad oral en nuestro país. Se ha comprobado que la infección por el HPV es un factor de riesgo del cáncer oral, y que afecta particularmente las amígdalas (hasta 75 % con respecto a otros sitios anatómicos de la cavidad oral) (1,7). En el 2004, Hafkamp, *et al.*, sugirieron que el tropismo viral por esta localización anatómica se explicaría por las características de mucosa de transición de

la cavidad oral, predominantemente en el tejido amigdalino, y su gran similitud histológica con la mucosa cervical (8).

La incidencia del cáncer de células escamosas en la cavidad oral inducido por HPV aumenta cada año, con tasas de prevalencia que fluctúan entre 36 y 80 %, dependiendo de la ubicación geográfica y la región anatómica (9-12). En Colombia solo se ha publicado el estudio sobre cáncer de cabeza y cuello asociado a HPV llevado a cabo por Quintero, *et al.*, en el cual se registró una prevalencia de HPV de 18,9 % (13). Este virus presenta más de 100 tipos virales y, aproximadamente, 40 genotipos se han asociado hasta la fecha con las infecciones anales y genitales; estos tipos de HPV se dividen, a su vez, en tres grupos según su asociación epidemiológica con el cáncer: tipos de alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, y 82; posiblemente de alto riesgo: 26, 53 y 66, y de bajo riesgo: 6, 11, 40, 42, 43, 44 y 70 (14-16). El genotipo de HPV encontrado con mayor frecuencia en el cáncer de células escamosas en la cavidad oral en todo el mundo, es el HPV-16 (12,17,18).

Los procesos de carcinogénesis asociados a HPV son promovidos por los genes virales *E6* y *E7*, ya que inhiben la acción de genes supresores de tumores como el *p53* y el *pRB*, inducen la proliferación celular e inhiben la apoptosis (3). Los genes virales *E6* y *E7* son regulados negativamente por los genes virales *E1* y *E2*, los cuales pueden fragmentarse ocasionalmente, lo cual produce la pérdida de control de la transcripción de las oncoproteínas *E6* y *E7* (19,20). Estos genes provocan la integración del genoma viral al ADN de las células del huésped, incrementando de esta forma la persistencia viral, mecanismo que opera principalmente en virus de alto riesgo (21,22). El ADN del HPV puede darse dentro de la célula humana de tres formas: integrado al genoma celular; libre en el núcleo celular, es decir, en forma episómica, y de forma mixta, es decir, integrada y episómica (21,23).

Correspondencia:

Dabeiba Adriana García, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 N° 40-62, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: (571) 320 8320, extensión 2899

garciad@javeriana.edu.co

Recibido: 23/06/15; aceptado: 22/10/15

En este contexto, el presente estudio se propuso identificar los tipos de HPV, principalmente los asociados al desarrollo del cáncer de células escamosas en la cavidad oral, clasificados como virus de alto riesgo, y, además, determinar otros factores virales involucrados, como la expresión de *E7* y el estado físico del genoma viral, los cuales podrían favorecer el desarrollo de este tipo de tumor.

Materiales y métodos

Este fue un estudio multicéntrico, descriptivo y de corte transversal, llevado a cabo en Bogotá, Manizales y Bucaramanga. La muestra se seleccionó mediante un muestreo no probabilístico a conveniencia entre 2013 y 2014. Se incluyeron pacientes con diagnóstico clínico de carcinoma de cavidad oral por el cirujano de cabeza y cuello y en espera de ser sometidos a cirugía.

Antes de la intervención quirúrgica, los pacientes incluidos firmaron el consentimiento informado y respondieron una encuesta epidemiológica, documentos que fueron aprobados por el Comité de Ética de la Pontificia Universidad Javeriana.

Después de la toma de la muestra de tejido tumoral, este se dividió en dos fragmentos, uno para el estudio histopatológico con el fin de confirmar el diagnóstico, y el otro se conservó en RNAlater® para su procesamiento posterior. La extracción de ADN y ARN se hizo con el kit AllPrep DNA/RNA/ ProteinQuiagen®, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Genotipificación del HPV

La genotipificación del HPV se hizo con el kit Multimetrix Multiplex HPV Genotyping RVO®. Inicialmente, se amplificó la región L1 del HPV mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple que contenía nueve cebadores sentido y tres antisentido 'biotinilados', y para evaluar la calidad del ADN, se incluyó un par de cebadores para amplificar el gen de β -globina; en este caso, el cebador antisentido también estaba 'biotinilado'. Posteriormente, se hizo la hibridación de los productos de PCR desnaturalizados para su conversión en microesferas que detectan 24 tipos virales: seis de bajo riesgo (6, 11, 42, 43, 44 y 70), 15 de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) y tres posiblemente de alto riesgo (26, 53 y 66). Para evidenciar la hibridación se añadieron el conjugado y el sustrato y, finalmente, las lecturas se hicieron en el equipo Luminex 100® bajo las condiciones sugeridas por el fabricante.

Expresión de la región E7 del HPV-16

Se diseñaron cebadores específicos para la región E7 (693 a 850 nucleótidos) del HPV-16 mediante el programa Primer3 y se corroboraron mediante alineamiento con el programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). El cebador sentido para el HPV-16 fue 5'AGCAGAACCGGACAGAGCCCA3' y el antisentido fue 5'TCTGAGAACAGATGGGGCACACA3'. Se construyó una curva estándar para la cuantificación absoluta mediante PCR en tiempo real, utilizando ADN del plásmido de HPV-16 (donado por el doctor zur Hausen, del *Deutsches Krebsforschungszentrum* - DKFZ, Alemania). Las diluciones del plásmido se hicieron por triplicado en base 10 a partir de un millón de copias hasta una copia, utilizando el compuesto Sybr Green, según la metodología descrita por Montalvo, et al., en el 2009 (24).

El ARN total extraído de cada muestra positiva para HPV-16 fue tratado con DNasa I (Invitrogen®) y la síntesis del ADN complementario (ADNc) se hizo con el kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Una vez obtenido el ADNc, se hizo la PCR en tiempo real por triplicado para cada muestra con 500 ng de ADNc y con el kit (KAPA SYBR® FAST qPCR). Como control positivo se utilizó ADN de la línea celular SiHa y, como control negativo, agua. Los niveles de expresión de las muestras se calcularon con base en los resultados de la curva estándar.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: Master mix 1X, 10 nM de cebadores con un volumen final de 10 μ l, y los siguientes ciclos: uno inicial a 95 °C durante tres minutos, 35 ciclos a 95 °C durante tres segundos y a 62 °C durante 30 segundos, tiempo en el cual se detectó la fluorescencia. Por último, se realizó una curva de fusión a 0,5 °C a partir de 65 °C y hasta 95 °C, con lecturas cada 0,5 segundos en un equipo CFX96® de Biorad.

Estado físico del HPV-16

Se diseñaron cebadores para los genes *E1* y *E2* con zonas superpuestas que cubrían la secuencia completa de los dos genes y cuyo esquema se muestra en la figura 1, en tanto que las secuencias de los cebadores se presentan en el cuadro 1. Como control para la normalización se amplificó la región E7 con los cebadores descritos en la sección de expresión de E7 para HPV-16.

En la primera reacción se amplificaron los fragmentos 1 y 3, y en la segunda, los fragmentos 2 y 4 (figura 1) para evitar inespecificidad en la reacción. Los

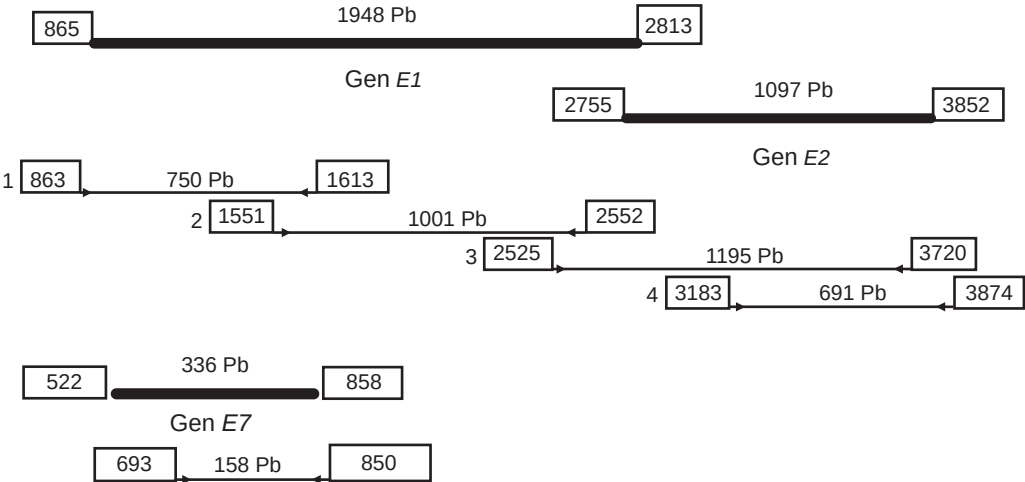


Figura 1. Esquema del diseño de los iniciadores del tipo viral HPV-16 para la determinación de su estado de integración mediante PCR múltiple y la evaluación de los genes *E1* y *E2* y parte del gen *E7*

Cuadro 1. Secuencias de los iniciadores empleados para comprobar el estado físico de HPV-16

Número de acceso	Región	Número del cebador	Tamaño del producto (pb)	Secuencia
NC.001526.2	E1 (nt 863-1613)	1	750	F5' CCATGGCTGATCCTGCAG 3' R5' CTGTCAGCTATACTGGGTGTAAGTC 3'
	E1 (nt 1551-2552)	2	1.001	F5' TAAATCAACGTGTTGCGATTG 3' R 5' AATAATGGAGGGCATTTTAGTTG 3'
	E1/E2 (nt 2525- 3720)	3	1.195	F 5' TGGTACAACATAAAATGCCCTCC 3' R 5' GTCCAATGCCATGTAGACGA 3'
	E2 (nt 3183-3874)	4	691	F 5' CATCAGTAAGTGTGGTAGAGGGTC 3' R 5' TGGATGCAGTATCAAGATTGTC 3'
AF477385	E7 (nt 693-850)	Control	158	F5'AGCAGAACCGGACAGAGCCCA3' R5'TCTGAGAACAGATGGGGCACACA 3'

productos se corrieron en electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % de acuerdo con la metodología descrita por Lukaszuk, *et al.*, en el 2003 (25). Posteriormente, se hallaron las densitometrías para cada fragmento de los amplicones E1, E2 y E7, utilizando un documentador de geles GelDoc® BioRad y el programa ImageLab™.

Mediante la cuantificación de la relación E1-E2/E7, se detectaron los estados físicos (episómico, integrado o mixto), los cuales se habían normalizado previamente con las razones densitométricas de E1-E2/E7 del plásmido HPV-16, que se utiliza como referencia para la forma episómica pura y ayuda a normalizar variaciones en la cinética de la PCR según la metodología desarrollada por Shukla, *et al.*, en el 2014 (26). Además, se empleó ADN de células CaSki (500 copias) y SiHa (una copia) como referencia de integración del genoma del HPV-16.

La normalización de E1-E2/E7 de las muestras clínicas con respecto al plásmido, se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Normalización de E1-E2/E7} = \frac{\text{Valor densitométrico (E1-E2/E7) de la muestra}}{\text{Valor densitométrico (E1-E2/E7) del plásmido}}$$

Un valor igual a 0 en la normalización de las muestras clínicas, es decir, ausencia total en la amplificación de los genes *E1* y *E2*, correspondía a la forma integrada pura del genoma del HPV-16, un valor de 1 o superior correspondía a la forma episómica pura, y los valores mayores de 0 y menores de 1 correspondían a la forma mixta (integrada y episómica) del ADN del HPV-16 (26).

La PCR se hizo con GoTaq Flexi Promega® usando 1X de solución tampón, 1,5 mM de MgCl₂, 100 mM de dNTP, 10 nM de cada cebador y 1 U

de polimerasa *Taq*, para un volumen final de 25 μ l. Los ciclos fueron los siguientes: uno a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante un minuto, a 62 °C durante otro minuto, a 72 °C durante 1,5 minutos, y un ciclo final a 72 °C durante 10 minutos.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue descriptivo y se utilizaron frecuencias relativas y absolutas, así como medidas de tendencia central. La comparación entre los grupos positivos y negativos para el HPV con respecto a las variables categóricas, se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Pearson (ji al cuadrado) en el programa SPSS®. La significación estadística se estableció con un valor de $p \leq 0,05$.

Resultados

En el estudio se incluyeron 46 pacientes con diagnóstico de carcinoma de células escamosas en la cavidad oral confirmado histopatológicamente. Después de la firma del consentimiento informado, se les solicitó a todos los pacientes responder a una encuesta sociodemográfica para recabar información sobre algunos factores de riesgo asociados a este tipo de tumor.

Características sociodemográficas

En el cuadro 2 se resumen las características sociodemográficas de la población objeto del estudio según la presencia o ausencia del HPV. Se observó que 67,39 % de los pacientes eran de sexo masculino, y 78,25 % eran mayores de 50 años; 54,35 % de ellos afirmó haber tenido entre una

Cuadro 2. Características sociodemográficas de la población objeto de estudio según la presencia o ausencia del HPV

Característica	Paciente n (%)	Positivo para HPV ^a n (%)	Negativo para HPV n (%)	p ^b
Total	46 (100,0)	10 (21,74)	36 (78,26)	
Sexo				0,336
Mujer	15 (32,61)	2 (13,33)	13 (86,67)	
Hombre	31 (67,39)	8 (25,81)	23 (74,19)	
Edad (años)				0,946
31 a 40	3 (6,52)	1 (33,33)	2 (66,67)	
41 a 50	7 (15,22)	1 (14,29)	6 (85,71)	
51 a 60	11 (23,91)	2 (18,18)	9 (81,82)	
61 a 70	11 (23,91)	3 (27,27)	8 (72,73)	
>71	14 (30,43)	3 (21,43)	11 (78,57)	
Compañeros sexuales				0,662
1 a 2	25 (54,35)	5 (20,00)	20 (80,00)	
3 a 4	9 (19,57)	3 (33,33)	6 (66,67)	
5 a 6	3 (6,52)	1 (33,33)	2 (66,67)	
>7	9 (19,57)	1 (11,11)	8 (88,89)	
Tabaquismo				0,969
Sí	9 (19,57)	2 (22,22)	7 (77,78)	
No	37 (80,43)	8 (21,62)	29 (78,38)	
Consumo de alcohol				0,573
Sí	15 (32,61)	4 (26,67)	11 (73,33)	
No	31 (67,39)	6 (19,35)	25 (80,65)	
Nivel sociodemográfico ^c				0,439
Bajo	13 (28,26)	3 (23,08)	10 (76,92)	
Medio	25 (54,35)	7 (28)	18 (72)	
Alto	4 (8,69)	0 (0,00)	4 (100,0)	
NR	4 (8,70)	0 (0,00)	4 (100,0)	
Ciudad				0,037
Bogotá	20 (43,48)	1 (5,00)	19 (95,00)	
Bucaramanga	5 (10,87)	1 (20,00)	4 (80,00)	
Manizales	21 (45,65)	8 (38,10)	13 (61,90)	

^a Positivo: nueve para HPV-16 y uno para HPV-58

^b Prueba de ji al cuadrado

^c Según criterios válidos en Colombia; datos de la Secretaría de Planeación de Bogotá, D.C., y del Departamento Administrativo Nacional de Estadística, DANE (Decreto 304 de 2008)

NR: no respondió

y dos parejas sexuales. En cuanto a los factores de riesgo, se encontró que 80,43 % (37/46) de los pacientes no fumaba, 67,39 % (31/46) no consumía alcohol y 6,5 % (3/46) consumía tabaco y alcohol. Con respecto al estrato socioeconómico, se encontró que 54,35 % de los pacientes pertenecía al estrato medio. En cuanto al lugar de procedencia, la mayoría de los pacientes provenía de Manizales, (45,65 %; 21/46) y de Bogotá (43,48 %; 20/46).

Tipos de HPV

En diez de los pacientes se detectó la presencia de HPV de alto riesgo, es decir, una frecuencia de 21,74 %. La prueba de ji al cuadrado mostró diferencias estadísticamente significativas en las regiones geográficas donde se recolectaron las muestras ($p=0,037$), evidenciándose en Manizales una asociación significativa con respecto a la infección por HPV de alto riesgo, en comparación con Bogotá y Bucaramanga.

En cuanto al genotipo más frecuente, se encontró que en nueve de las diez (90 %) muestras positivas este correspondía al HPV-16. El otro tipo viral de alto riesgo fue el HPV-58, el cual se encontró en el restante 10 %.

Niveles de expresión del HPV-16

Con base en los resultados de la genotipificación del HPV realizada con la técnica de Luminex®, los niveles de expresión del genotipo HPV-16 (el tipo viral más prevalente en la población de estudio), se determinaron mediante cuantificación absoluta con una PCR en tiempo real. Con este fin se construyó una curva estándar con plásmido a partir de un millón de copias hasta llegar a una, con lo cual se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0,99.

La determinación de los niveles de expresión fue posible en seis de las nueve muestras (66,7 %), en la cual el número de copias transcritas en 500 ng de ADNc osciló entre una y 11 copias. Las copias por debajo de 1 se consideraron como inactivas en la transcripción (cuadro 3).

Estado físico del HPV-16

Se determinó el estado físico del HPV-16 mediante PCR múltiple con dos reacciones para amplificar la región completa de los genes *E1* y *E2*. En la primera reacción se amplificaron los fragmentos 1 y 3, y en la segunda, los fragmentos 2 y 4; también se amplificó la región *E7* como control en las dos reacciones. En el cuadro 4 se muestran las razones densitométricas halladas para cada fragmento.

De acuerdo con los resultados obtenidos de las razones densitométricas en las muestras normalizadas, se determinó que ocho de nueve muestras (89 %) presentaban un estado físico mixto (episómico e integrado) para el HPV-16 y una de nueve muestras (11 %) presentó un estado físico episómico, con prevalencia de la disrupción en el sitio de unión de *E1* y *E2* correspondiente al producto 3.

Con base en estos resultados, se compararon los niveles de expresión y el estado físico del HPV-16, y se determinó que no había diferencia significativa en el incremento de la expresión del gen *E7* en las formas mixtas o episómicas del genoma.

Discusión

El HPV puede ser un factor de riesgo para el carcinoma de células escamosas en la cavidad oral. En el presente estudio se encontró una tasa de prevalencia baja de HPV (21,74 %) comparada con lo informado en otros países del mundo: Estados Unidos (72 %) (27), Canadá (53 %) (9), Alemania (30 a 50 %) y los países escandinavos (90%) (19). Sin embargo, este porcentaje fue más alto que el reportado en un estudio de cabeza y cuello realizado en Medellín por Quintero, *et al.*, en el cual la tasa de prevalencia de HPV en la cavidad oral fue de 13,3 % determinada con la técnica de *reverse line blot* (13). Una posible explicación de las diferencias de prevalencia sería el tipo de técnica utilizada; en la técnica de *reverse line blot* se utilizan los cebadores GP5+/GP6+, los cuales amplifican la región L1, en tanto que en la técnica de Luminex (utilizada en este estudio), además de estos cebadores, se emplean ocho cebadores sentido y dos antisentido de amplio espectro,

Cuadro 3. Transcritos de *E7* obtenidos de las nueve muestras positivas para HPV-16

Código del paciente	Transcritos de <i>E7</i>
17M	<1
12M	<1
4M	1
6M	<1
8	2
8M	11
5M	1
5B	1
1M	4

Los transcritos de *E7* para HPV-16 se calcularon mediante cuantificación absoluta con PCR en tiempo real, utilizando una curva estándar con diferentes concentraciones del plásmido de HPV-16 (ver sección de Materiales y métodos).

Cuadro 4. Razones densitométricas de los amplicones E1, E2 y E7 normalizados con la razón E1-E2/E7 del plásmido HPV-16. Los valores iguales a 0 correspondían a la forma integrada pura del genoma del HPV-16, los valores iguales o superiores a 1, a la forma episómica pura, y los valores mayores de 0 y menores de 1, a la forma mixta.

Código del paciente	Región E1/E2				Estado físico (%)
	Producto 1	Producto 2	Producto 3	Producto 4	
	E1 (nt 863 a 1613) pb 750	E1 (nt 1551 a 2552) pb 1001	E1/E2 (nt 2525 a 3720) pb 1195	E2 (nt 3183 a 3874) pb 691	
17M	0,28	0,41	0,08	0,33	Mixto (89%)
12M	0,5	0,43	0,25	0,4	
4M	0,65	0,85	0,25	0,74	
8	0,22	0,64	0	0,51	
8M	0,16	0,05	0,08	0,51	
5M	0,26	0,55	0,38	0,52	
1M	1,7	1,12	0,39	1,31	
6M	1,52	2,14	0,59	1,69	
5B	1,75	1,31	1,07	1,25	
Estado físico por fragmento (%)	Mixto (66 %) Episómico (34 %)	Mixto (66 %) Episómico (34 %)	Mixto-integrado (88 %) Episómico (12 %)	Mixto (66 %) Episómico (34 %)	100 %
SiHa	1,63	2,04	0	0,09	Episómico (11 %)
CasKi	0,28	0,4	0,05	0,47	

que amplifican la misma región y se denominan BSGP5+/BIO-BSGP6+, lo cual permite una mayor detección de ADN viral.

En este estudio, los casos positivos para HPV fueron ligeramente más frecuentes en hombres (25,81 %) que en mujeres (13,33 %), información que coincide con lo reportado en otros informes sobre una mayor incidencia de las infecciones orales por HPV en hombres que en mujeres (7). Con respecto a la edad, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas y la mayoría de los pacientes era mayor de 50 años, se encontró una tendencia a registrar una mayor prevalencia de la infección con HPV en las personas entre los 31 y los 40 años de edad, lo cual también corrobora otros estudios en los que, generalmente, los casos positivos para HPV se presentan más entre las personas más jóvenes (6,10,28).

En el presente estudio no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la infección oral por HPV y el número de parejas sexuales; sin embargo, los casos positivos para HPV tendieron a presentarse más en pacientes con más de dos parejas sexuales. Otros estudios han demostrado que un gran número de parejas y la práctica de sexo oral aumentan las probabilidades de adquirir la infección por el HPV (29).

En cuanto a otros factores de riesgo, los resultados obtenidos en este estudio para los casos positivos para HPV se registraron tanto en las personas que

no consumían alcohol ni tabaco, como en las que lo hacían, y fueron muy similares a los encontrados en otras partes del mundo (28,29). En otros estudios se han encontrado asociaciones estadísticamente significativas al establecer que el consumo de más de diez paquetes de cigarrillo al año en pacientes positivos para HPV aumentaba el riesgo de muerte (30).

Con respecto a las regiones geográficas de recolección de las biopsias, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de infección por HPV de alto riesgo entre las muestras de pacientes procedentes de Manizales ($p=0,037$) y aquellas de otras ciudades. Una posible explicación puede estar relacionada con el incremento del número de parejas sexuales, pues aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, sí se registró una tendencia a presentar más de dos parejas sexuales en las personas provenientes de dicha ciudad.

El tipo viral detectado con mayor frecuencia en la población de estudio fue el HPV-16 (90 %), seguido por el HPV-58 (10 %). Esta frecuencia es más alta que la reportada por Steinau, *et al.*, en el 2014, en cuyo estudio la frecuencia del genotipo HPV-16 fue de 60,5 % en Estados Unidos (27), aunque es necesario aclarar que la población de estudio fue mucho mayor (403 casos). La alta frecuencia de HPV-16 ratifica lo encontrado en la mayoría de las publicaciones, e indica que este tipo viral es el más persistente en los casos de carcinoma de

células escamosas en la cavidad oral en el mundo y es considerado como un factor de riesgo para su desarrollo (9,31,32). Los estudios sobre la presencia del HPV-58 en este cáncer son escasos, ya que este tipo viral es poco frecuente en esta enfermedad. En un estudio de Baradacco, *et al.*, llevado a cabo en el 2007 en Italia, se reportó una frecuencia de 4,7 % para este tipo viral en 115 pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, de los cuales 21 fueron positivos para HPV (32). En un estudio de 2013, Baboci, *et al.*, reportaron actividad biológica del virus HPV-58 en tejido tumoral de personas con carcinoma de células escamosas en la cavidad oral, lo cual demostró su implicación en el desarrollo del carcinoma (33).

Se ha establecido que el potencial oncogénico del HPV-16 reside en la expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7, las cuales interrumpen la vía de señalización de p53 y pRb; por lo tanto, para analizar la actividad oncogénica del HPV es necesario determinar si el virus se transcribe o no (6). En algunos estudios se ha enfatizado en la importancia de determinar la presencia del virus, ya que los pacientes positivos para la infección viral muestran un mejor pronóstico que los negativos. Por otro lado, la supervivencia de los pacientes positivos para HPV-16 en quienes, además, el virus está activo en la transcripción, es mayor comparada con los pacientes positivos para HPV-16 *inactivo* en la transcripción (34).

En resumen, la presencia viral y la expresión de E6 y E7 son un indicativo del pronóstico del paciente. En su metanálisis del 2014, Ndiaye, *et al.*, reportaron como biomarcadores del cáncer de cabeza y cuello la presencia de ADN del HPV, de transcritos virales y de la oncoproteína p16INK4a (12). Por el contrario, en el 2012 Holzinger, *et al.*, observaron que la oncoproteína p16INK4a no mostraba ningún valor pronóstico, pero que los pacientes con ausencia de los patrones de ARN E6*I o E6*II (descritos con anterioridad en el modelo de cáncer de cuello uterino) presentaban un comportamiento similar a los pacientes negativos para la infección por HPV, lo cual sugeriría que los mejores biomarcadores, además de la presencia del ADN viral, son los patrones de ARN (35).

En el presente estudio se evaluó el número de copias transcritas de HPV-16 utilizando ARNm de la región E7 mediante PCR cuantitativa en tiempo real, y se encontró que el número de copias activas en la transcripción osciló entre uno y 11. Es

decir, los niveles de expresión analizados en las muestras fue bajo y solo se evidenciaron en seis de las nueve muestras positivas para HPV-16 (66 %). Similares resultados se encontraron en un estudio de carcinoma de células escamosas en la cavidad oral realizado en Francia, en el cual se reportó que, de 24 casos positivos para HPV, 16,50 % de las muestras expresaba las oncoproteínas E6 y E7 (34). Igualmente, los resultados de otro estudio difieren de lo reportado en el nuestro, ya que ninguna de las 91 muestras positivas para HPV-16 se encontraba activa en la transcripción (36). Es importante señalar que hubiera sido interesante medir el número de copias con ADN viral para determinar cuántas de ellas se encontraban activas en la transcripción. Holzinger, *et al.*, demostraron que las muestras de los pacientes con carcinoma de células escamosas en la cavidad oral con carga viral baja de HPV-16 se encontraban activas en la transcripción (35).

En cuanto al estado físico de los HPV de alto riesgo, algunos autores han establecido que el virus puede integrarse al genoma del huésped por ruptura de los genes virales E1 y E2, que son los encargados de controlar negativamente la expresión de E6 y E7, con lo cual el virus puede persistir e incrementar el riesgo de desarrollar cáncer (37). En la línea de células de cuello uterino W12, se demostró la integración del HPV-16, el cual provoca un aumento de la expresión de los oncogenes E6 y E7, en comparación con los que se encuentran en estado episómico (38). En contraste, en un estudio en queratinocitos primarios inmortalizados, con presencia de genomas de HPV-16, se demostró que la interrupción de la secuencia del gen E2 tras la integración viral no aumentaba la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 (39). Por ello, en el presente estudio se analizó el estado físico del HPV-16 en el carcinoma de células escamosas en la cavidad oral.

El estado físico del HPV-16 en las muestras se analizó mediante PCR múltiple, y se encontró que el estado físico viral más frecuente fue la forma mixta (89 %), seguida de la forma episómica (11 %). La disrupción del genoma viral para integrarse al genoma de la célula huésped, ocurrió en diferentes regiones de los genes E1 y E2, prevaleciendo la disrupción en el sitio de unión de E1 y E2 (2.525 a 3.720 nucleótidos). Estos resultados difieren con lo reportado por algunos autores. Por ejemplo, en 2014, Olthof, *et al.*, mediante PCR mediada por ligadura, encontraron que en 75 pacientes con

carcinoma de células escamosas en la cavidad oral positivos para HPV-16 el estado físico más frecuente fue el episómico (61 %) y el menos frecuente, el integrado (39 %). Encontraron, además, que la integración del ADN viral afectaba con mayor frecuencia los sitios de unión de los genes *E1* y *E2* (62 %), seguidos por el rompimiento del gen *E2* (38 %) (39), lo cual coincide parcialmente con lo encontrado en el presente estudio. En otros estudios en los que se analizaban diferentes regiones anatómicas de cabeza y cuello, se ha reportado que en las amígdalas el genotipo viral más frecuente es el HPV-16 (cinco de seis casos), seguido del HPV-35 (uno de seis casos); además, utilizando PCR múltiple para amplificar las regiones *E1*, *E2* y *E6*, se encontró que el estado físico más prevalente era el integrado (32). Estos hallazgos contradicen los reportados por Mellin, *et al.*, en 2002, quienes encontraron por medio del método *rlipCR* (*Restriction enzyme cleavage, Ligation and PCR*) (40) que el estado físico del HPV-16 más frecuente en las amígdalas era el episómico (ocho de 11 casos), seguido del mixto (dos de 11 casos) y del integrado (uno de 11 casos). Con base en lo expuesto se puede inferir que no hay un tipo de técnica estandarizada para determinar el estado físico del genoma viral, lo cual puede repercutir en la heterogeneidad de los resultados de los diferentes estudios.

Los resultados del presente estudio no evidenciaron diferencias en la expresión del gen *E7* cuando el genoma viral de HPV-16 estaba en forma episómica o mixta. Estos resultados son similares a los reportados por Olthof, *et al.*, en su estudio del 2014, en el cual demostraron que la integración del genoma del HPV-16 no aumentaba los niveles de expresión de las oncoproteínas *E6* y *E7* en el carcinoma de células escamosas en la cavidad oral; asimismo, se encontró que los niveles de expresión del gen *E2* no se veían afectados en el estado físico episómico o integrado (39).

Entre las limitaciones del estudio debe mencionarse que la muestra se seleccionó por conveniencia, con un total de 46 casos en el momento de la cirugía, y que no fue posible conocer el estadio del cáncer en todos los casos, por lo cual este criterio no se tuvo en cuenta.

Agradecimientos

A los pacientes del Hospital Universitario San Ignacio, del Hospital de Manizales y del Hospital de Bucaramanga participantes en el estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiación

Este estudio fue financiado por la Pontificia Universidad Javeriana en el marco del proyecto "Genotipificación, niveles de expresión y estado de integración del virus de papiloma humano en el carcinoma orofaríngeo de células escamosas" (PUJ ID de proyecto 5283).

Referencias

1. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005. p. 168-75.
2. Westra WH. The morphologic profile of HPV-related head and neck squamous carcinoma: Implications for diagnosis, prognosis, and clinical management. *Head Neck Pathol.* 2012;6:48-54. <http://dx.doi.org/10.1007/s12105-012-0371-6>
3. Woods R, O'Regan EM, Kennedy S, Martin C, O'Leary JJ, Timon C. Role of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma: A review. *World J Clin Cases.* 2014;2:172-93. <http://dx.doi.org/10.12998/wjcc.v2.i6.172>
4. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol.* 2008;26:612-9. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2007.14.1713>
5. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Fecha de consulta: 20 de febrero de 2015. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.
6. van Monsjou HS, Balm AJ, Brekel MM, Wreesmann VB. Oropharyngeal squamous cell carcinoma: A unique disease on the rise?. *Oral Oncol.* 2010;46:780-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.08.011>
7. Genden EM, Sambur IM, de Almeida JR, Posner M, Rinaldo A, Rodrigo JP, *et al.* Human papillomavirus and oropharyngeal squamous cell carcinoma: What the clinician should know. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013;270:405-16. <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-012-2086-4>
8. Hafkamp HC, Manni JJ, Speel EJ. Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol.* 2004;124: 520-6.
9. Nichols AC, Dhaliwal SS, Palma DA, Basmaji J, Chapeskie C, Dowthwaite S, *et al.* Does HPV type affect outcome in oropharyngeal cancer? *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;42:1-9. <http://dx.doi.org/10.1186/1916-0216-42-9>
10. Evans M, Newcombe R, Fiander A, Powell J, Rolles M, Thavaraj S, *et al.* Human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: An observational study of diagnosis, prevalence and prognosis in a UK population. *BMC Cancer.* 2013;13:1-10. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-13-220>

11. **Machiels JP, Lambrecht M, Hanin FX, Duprez T, Gregoire V, Schmitz S, et al.** Advances in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck. *F1000prime Rep.* 2014;6:44. <http://dx.doi.org/10.12703/P6-44>
12. **Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsagué X, Laporte L, et al.** HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2014;15:1319-31. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70471-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70471-1)
13. **Quintero K, Giraldo GA, Uribe ML, Baena A, López C, Alvarez E, et al.** Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2013;79:375-81. <http://dx.doi.org/10.5935/1808-8694.20130065>
14. **Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M.** Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1050-9. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02227-07>
15. **Muñoz N, Bosch FX, de San José S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al.** Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:518-27. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa021641>
16. **de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H.** Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324:17-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
17. **Marklund L, Hammarstedt L.** Impact of HPV in Oropharyngeal Cancer. *J Oncol.* 2011;2011:1-6. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/509036>
18. **Betiol J, Villa LL, Sichero L.** Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2013;46:217-26. <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20132703>
19. **Wittekindt C, Wagner S, Mayer CS, Klusmann JP.** Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. *GMS Curr TopOtorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2012;11:1-29. <http://dx.doi.org/10.3205/cto000091>
20. **Castillo A.** HPV infection and carcinogenesis in the upper aero-digestive tract. *Colomb Med.* 2011;42:233-42.
21. **Feller L, Wood NH, Khammisa NA, Lemmer J.** Human papillomavirus mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: Human papillomavirus-mediated carcinogenesis. *Head Face Med.* 2010;6:1-5. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-160X-6-15>
22. **Narisawa-Saito M, Kiyono T.** Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 2007;98:1505-11. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00546.x>
23. **Bisht M, Bist SS.** Human papilloma virus: A new risk factor in a subset of head and neck cancers. *J Cancer Res Ther.* 2011;7:251-5. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-1482.87004>
24. **Montalvo M, Resendiz M, Santos G, Vallejo V, Reyes J, Hernández J.** Estandarización de un método de detección molecular del virus influenza (H5N1) de alta patogenicidad. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2009;43:49-52.
25. **Lukaszuk K, Liss J, Wozniak I, Emerich J, Wójcikowski C.** Human papillomavirus type 16 status in cervical carcinoma cell DNA assayed by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2003;41:608-12. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.2.608-612.2003>
26. **Shukla S, Mahata S, Shishodia G, Pande S, Verma G, Hedau S, et al.** Physical state & copy number of high risk human papillomavirus type 16 DNA in progression of cervical cancer. *Indian J Med Res.* 2014;139:531-43.
27. **Steinau M, Saraiya M, Goodman MT, Peters ES, Watson M, Cleveland JL, et al.** Human papillomavirus prevalence in oropharyngeal cancer before vaccine introduction, United States. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:822-8. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2005.131311>
28. **Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA.** HPV-associated head and neck cancer: A virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol.* 2010;11:781-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70017-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70017-6)
29. **D'Souza G, Kreimer A, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al.** Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Eng J Med.* 2007;356:1944-56. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa065497>
30. **Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al.** Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Eng J Med.* 2010;363:24-35. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0912217>
31. **Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S.** Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:467-75. <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0551>
32. **Badaracco G, Rizzo C, Mafera B, Pichi B, Giannarelli D, Rahimi SS, et al.** Molecular analyses and prognostic relevance of HPV in head and neck tumours. *Oncol Rep.* 2007;17:931-9. <http://dx.doi.org/10.3892/or.17.4.931>
33. **Baboci L, Boscolo-Rizzo P, Holzinger D, Bertorelle R, Biasini L, Michel A, et al.** Evidence of the causal role of human papillomavirus type 58 in an oropharyngeal carcinoma. *Virol J.* 2013;10:1-6. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-10-334>
34. **Jung AC, Briolat J, Millon R, de Reyniès A, Rickman D, Thomas E, et al.** Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2010;126:1882-94. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24911>
35. **Holzinger D, Schmitt M, Dyckhoff G, Benner A, Pawlita M, Bosch FX.** Viral RNA patterns and high viral load reliably define oropharynx carcinomas with active HPV16 involvement. *Cancer Res.* 2012;72:4993-5003. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3934>
36. **Rietbergen M, Braakhuis B, Moukhtari N, Bloemena E, Brink A, Sie D, et al.** No evidence for active human papillomavirus (HPV) in fields surrounding HPV-positive oropharyngeal tumors. *J Oral Pathol Med.* 2014;43:137-42. <http://dx.doi.org/10.1111/jop.12123>

37. **Lewis JS, Ukpo OC, Ma XJ, Flanagan JJ, Luo Y, Thorstad WL, et al.** Transcriptionally-active high-risk human papillomavirus is rare in oral cavity and laryngeal/hypopharyngeal squamous cell carcinomas –a tissue microarray study utilizing E6/E7 mRNA in situ hybridization. *Histopathology*. 2012;60:982-91. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.04169.x>
38. **Jeon SY, Lambert PF.** Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: Implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:1654-8.
39. **Olthof NC, Speel EM, Kolligs J, Haesevoets A, Henfling M, Ramaekers FC, et al.** Comprehensive analysis of HPV16 integration in OSCC reveals no significant impact of physical status on viral oncogene and virally disrupted human gene expression. *PLoS One*. 2014;9:1-8. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088718>
40. **Mellin H, Dalhgren L, Munck-Wikland E, Lindholm J, Rabbani H, Kalantari M, et al.** Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer*. 2002;102:152-8. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.10669>

ARTÍCULO ORIGINAL

Análisis filogenético del virus del chikungunya en Colombia: evidencia de selección purificadora en el gen *E1*

Katherine Laiton-Donato¹, José A. Usme-Ciro², Angélica Rico¹, Lissethe Pardo¹, Camilo Martínez¹, Daniela Salas³, Susanne Ardila⁴, Andrés Páez^{1,2}

¹ Grupo de Virología, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de La Salle, Bogotá, D.C., Colombia

³ Grupo de Enfermedades Transmitidas por Vector, Dirección de Vigilancia y Análisis de Riesgo en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Grupo de Entomología, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El virus del chikungunya, perteneciente al género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*, es un virus ARN de 11,8 kb, de cadena sencilla y polaridad positiva, transmitido por *Aedes* spp. Se han identificado tres genotipos a nivel mundial: el de Asia, el del este-centro-sur de África (*East/Central/South African*, ECSA) y el de África occidental (*West African*, WA). La fiebre del chikungunya es una enfermedad febril aguda, acompañada principalmente de inflamación en las articulaciones y erupción cutánea. Después de su aparición en las Américas en el 2013, los primeros casos en Colombia ocurrieron en septiembre de 2014 y hasta junio del 2015 se habían notificado 399.932 casos.

Objetivo. Identificar el genotipo o los genotipos responsables de la primera epidemia por el virus del chikungunya en Colombia y la variabilidad genética asociada a su dispersión en el territorio nacional.

Materiales y métodos. Se seleccionaron muestras de suero de pacientes con síntomas indicativos de fiebre del chikungunya durante 2014 y 2015. Se hizo una transcripción inversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa del gen *E1*, así como su secuenciación, análisis filogenético y análisis de evolución adaptativa.

Resultados. Se demostró la presencia exclusiva del genotipo de Asia en Colombia. Se registró un promedio de 0,001 sustituciones de bases por sitio, una identidad de 99,7 a 99,9 % en los nucleótidos y de 99,9 % en los aminoácidos entre las secuencias colombianas y las secuencias de las Américas. Los análisis de evolución adaptativa indicaron una fuerte selección purificadora en el gen *E1*.

Conclusiones. Se determinó la circulación del genotipo de Asia del virus del chikungunya como la causa de la primera epidemia en Colombia. Es necesario continuar con la vigilancia de genotipos, con el fin de detectar posibles cambios en la epidemiología, la eficacia (*fitness*) viral y la patogenia del virus.

Palabras clave: virus del chikungunya, vigilancia, genotipo, filogenia, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2990>

Phylogenetic analysis of Chikungunya virus in Colombia: Evidence of purifying selection in the *E1* gene

Introduction: Chikungunya virus (CHIKV) is a single-stranded positive sense RNA virus that belongs to the *Alphavirus* genus of the family *Togaviridae*. Its genome is 11.8 kb in length, and three genotypes have been identified worldwide: Asian, East/Central/South African (ECSA) and West African. Chikungunya fever is an acute febrile disease transmitted by *Aedes* spp. that usually presents with polyarthralgia and cutaneous eruption. Following introduction of the virus to the Americas in 2013, the first cases in Colombia occurred in September of 2014, and they reached a cumulative total of 399,932 cases by June of 2015.

Objective: To identify the genotype or genotypes responsible for the current epidemic in Colombia and to describe the genetic variability of the virus in the country.

Materials and methods: Serum samples from patients presenting with symptoms compatible with Chikungunya fever during 2014-2015 were selected for the study. RT-PCR products of the *E1* gene from these samples were used for sequencing and subsequent phylogenetic and adaptive evolution analyses.

Contribución de los autores:

Katherine Laiton-Donato y José A. Usme-Ciro: concepción y diseño del estudio

Todos los autores participaron en el análisis y la interpretación de los resultados, la revisión crítica del manuscrito, la aprobación de la versión final y de todos los aspectos del manuscrito.

Results: The study identified only the presence of the Asian genotype in Colombia. Comparing the Colombian sequences with other sequences from the Americas revealed an average of 0.001 base substitutions per site, with 99.7% and 99.9% nucleotide identity and 99.9% amino acid identity. The adaptive evolution analysis indicated that the *E1* gene is under strong purifying selection.

Conclusions: The first epidemic of Chikungunya fever in Colombia was caused by the circulation of the virus Asian genotype. Further genotypic surveillance of the virus in Colombia is required to detect possible changes in its epidemiology, fitness and pathogenicity.

Key words: Chikungunya virus, surveillance, genotype, molecular epidemiology, phylogeny, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2990>

El virus del chikungunya pertenece al género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*, y es un importante patógeno reemergente transmitido por mosquitos del género *Aedes*. Es un virus encapsulado de 60 a 70 nm de diámetro, el cual posee una cápside de simetría icosaédrica que alberga un genoma de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de 11,8 kb, aproximadamente (1). El genoma del virus codifica para cuatro proteínas no estructurales (nsP1 – nsP4), las cuales participan en la replicación del ARN viral y en la producción de ARN mensajero (ARNm) subgenómico, el cual codifica, a su vez, para las cinco proteínas estructurales C, E3, E2, 6K y E1. La proteína E1 forma heterodímeros con E2, los cuales son transportados a la membrana celular para hacer parte de los viriones maduros luego de la gemación de las nucleocápsides (2).

El virus fue aislado por primera vez e identificado como el agente etiológico responsable de un brote de enfermedad febril en Tanzania entre 1952 y 1953 (3).

La fiebre del chikungunya es una enfermedad febril aguda, con un periodo de incubación de dos a 12 días, cuyas principales manifestaciones clínicas incluyen fiebre alta, mialgias, artralgias o artritis, linfadenopatías, dolores multifocales y erupción cutánea (1). La fase aguda de la enfermedad puede resolverse en un periodo de siete a 14 días, en tanto que la fase crónica, caracterizada por manifestaciones reumatológicas, puede persistir durante meses e incluso años (4).

El virus aumentó su rango de distribución entre los años 60 y 70, con brotes en diversos países asiáticos y en el subcontinente indio. En el 2004

emergió nuevamente de forma epidémica en el este de África, y rápidamente se distribuyó en países tropicales y subtropicales de África, Asia y Oceanía (5,6). En 2013 llegó a la región de las Américas a través de la isla Saint Martin y en poco tiempo se diseminó por diversas islas del Caribe y varios países de la región (7-9).

En Colombia el primer caso de fiebre del chikungunya importado se registró en Cali el 19 de junio de 2014, y los primeros casos de transmisión autóctona se notificaron en septiembre de 2014, con un total de 399.932 casos y 39 muertes desde el inicio de la epidemia hasta la semana epidemiológica 25 de 2015 (10), lo cual es el resultado de su transmisión en una población humana vulnerable en zonas con gran densidad del vector *Aedes aegypti*.

El análisis filogenético de las cepas del virus del chikungunya que circulan a nivel mundial ha permitido la identificación de tres linajes denominados genotipo de Asia, genotipo del este-centro-sur de África (*East/Central/South African*, ECSA) y genotipo de África occidental (*West African*, WA) (11-13); se estima que el ancestro común más reciente de los tres genotipos pudo haberse originado hace 500 años, aproximadamente, y que la divergencia entre el genotipo de Asia y el de ECSA pudo haber ocurrido hace 150 años (14). En un análisis del gen *E1* se encontró una tasa de sustitución de $1,4 \times 10^{-3}$ por sitio por año (15).

El genotipo de Asia ha sido el principal responsable de la enfermedad en las islas del Caribe y en Centroamérica y Suramérica (9,16); sin embargo, recientemente se reportó la presencia del genotipo ECSA en Brasil (17). Por ello, es de vital importancia determinar los genotipos de los virus responsables de la epidemia actual en Colombia y la variabilidad genética asociada a su diseminación en el territorio nacional, lo cual contribuye al conocimiento de la dinámica de circulación y transmisión del virus.

Correspondencia:

Andrés Páez, Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 220 7700, extensión 1405
apaezm@ins.gov.co y apaez@unisalle.edu.co

Recibido: 21/07/15; aceptado: 22/10/15

Materiales y métodos

Muestras clínicas

Se seleccionaron 29 muestras de suero remitidas al Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud entre 2014 y 2015, por sospecha clínica de fiebre del chikungunya en el marco del programa de vigilancia virológica del virus a nivel nacional.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

En 18 de las 29 muestras, la detección del virus se hizo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real con el gen *nsP4* y utilizando el estuche *SuperScript III Platinum One-step*[®] (Invitrogen). Se utilizaron 0,4 mM de cada dNTP, 10 pmol de los oligonucleótidos CHIKV 6856/CHIKV 6981c y 5 µM de la sonda CHIKV 6919-FAM diseñados previamente, y 1 µl de la mezcla de enzimas (18), para un volumen final de la reacción de 25 µl. El perfil térmico incluyó un paso de transcripción inversa a 50 °C durante 30 minutos, la activación de la ADN polimerasa *Taq Hot Start* a 94 °C durante 15 minutos, 45 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y a 60 °C durante un minuto para su hibridación y extensión.

Aislamiento viral

Las 11 muestras restantes se diluyeron en medio esencial mínimo de Eagle (E-MEM) en proporción de uno a diez y, posteriormente, se utilizaron en el intento de aislamiento viral inoculando 200 µl en cultivos de células Vero. La fase de adhesión se llevó a cabo a 37 °C durante una hora, momento en el cual se añadieron 800 µl de E-MEM con suplemento de 2 % de suero fetal bovino (FBS) y la solución tampón HEPES. Los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera con CO₂. Los sobrenadantes de los aislamientos se recolectaron cuando se observó el efecto citopático, o a los cinco días de infección en caso de no observarse dicho efecto.

Extracción de ARN

El ARN viral se extrajo a partir de 18 muestras de suero y de 11 sobrenadantes de cultivo, utilizando el siguiente protocolo recomendado por el fabricante del estuche comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit*[®] (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA): se mezclaron 140 µl de muestra con 560 µl de solución tampón AVL y 5,6 µl de ARN *carrier*; luego, se agregaron 500 µl de etanol absoluto y el volumen total se pasó a través de una columna de sílice mediante centrifugación. Posteriormente, se adicionaron 500 µl de solución tampón AW1 y 500 µl de AW2 para eliminar contaminantes y, por último, se eluyó mediante la adición de 60 µl de solución tampón AVE con centrifugación.

Amplificación del gen E1 mediante transcripción inversa seguida de PCR

La PCR en tiempo real para la amplificación de un fragmento de 1.666 pares de bases (pb) que incluía el gen *E1* completo, se hizo utilizando el estuche *QIAGEN One-Step RT-PCR kit*[®] (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) y los oligonucleótidos diseñados en este estudio (cuadro 1).

Se utilizaron 10 pmol de los oligonucleótidos CHIKseq_17F y CHIKV_4R, 5 µl de solución tampón 5X (que incluía 12,5 mM de MgCl₂), 1 µl de la mezcla de enzimas, 0,4 mM de cada dNTP y la solución Q en una concentración final de 1X para un volumen final de 25 µl. El perfil térmico consistió en un paso de transcripción inversa a 41 °C durante 45 minutos, un paso de activación de la ADN polimerasa *Taq Hot Start* a 94 °C durante 15 minutos, 40 ciclos a 94 °C durante 30 segundos para la desnaturalización, a 58 °C durante 30 segundos para la hibridación de oligonucleótidos, y a 72 °C durante dos minutos para la extensión, seguidos de una extensión final a 72 °C durante cinco minutos. Los amplicones se purificaron a partir de las reacciones de RT-PCR en tiempo real con el estuche comercial *QIAquick PCR Purification Kit*[®] (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA).

Cuadro 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación y secuenciación del gen *E1* del virus del chikungunya

Oligonucleótido	Uso	Secuencia 5'-3'	Posición genómica ¹
CHIKseq_17F	PCR en tiempo real y secuenciación	GTAAGTTKTGTCAGTGGCCTCGTTC ²	9646
CHIKseq_19F	Secuenciación	CCRTACTCTCAGGCACCATCT ²	10687
CHIKV_4R	PCR en tiempo real y secuenciación	TTAGTGCCTGCTRAACGACACG ²	11313
CHIKseq_2R	Secuenciación	CGCTCTTACCGGGTTTGTTGCTAT	10797
CHIKseq_3R	Secuenciación	CTTCTCCACATGTGCTTCGCTCA	10323

¹ Con respecto a la secuencia NC_004162.2 depositada en el Genbank

² Según el código de ambigüedad en nucleótidos de la *International Union of Pure and Applied Chemistry* - IUPAC

Secuenciación y edición de secuencias

Las secuencias se obtuvieron usando los oligonucleótidos descritos en el cuadro 1. Se agregaron 10 ng de cada amplicón a una mezcla de reacción que contenía 1 µl de *BigDye Terminator Cycle Sequencing*® v3.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), 3,2 pmol del oligonucleótido específico y 1,5 µl de solución tampón 5X, en un volumen final de 10 µl. El perfil térmico fue el siguiente: a 96 °C durante un minuto; 25 ciclos a 96 °C durante 10 segundos, a 50 °C durante 5 segundos y a 60 °C durante 4 minutos. Las reacciones se purificaron con el estuche *Big Dye XTerminator*® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) y posteriormente se procesaron mediante el analizador genético ABI3130 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Las secuencias se editaron y ensamblaron mediante el módulo SeqMan del programa *LaserGene*®, v8.1 (DNASTAR Inc.).

Análisis filogenético

Con el fin de establecer la relación filogenética entre las cepas del virus del chikungunya circulantes en Colombia y las que han circulado a nivel mundial, se generó una matriz de secuencias correspondientes al gen *E1* obtenidas en el presente estudio (posiciones de los nucleótidos 9994-11313 con respecto a la secuencia NC_004162.2), y las secuencias depositadas en el GenBank correspondientes a los tres genotipos, las cuales fueron alineadas mediante el programa Clustal X2.1 (19).

Se estimó el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustara a la matriz de secuencias teniendo en cuenta el criterio de información de Akaike (AIC), mediante la herramienta jModelTest v2.1.3 (20).

Se hizo una inferencia bayesiana mediante el método de Monte Carlo vía cadenas de Markov (MCMC) con el programa MrBayes 3.2.6 (21); se utilizó el modelo de sustitución de nucleótidos GTR, y se evaluaron cuatro MCMC (tres frías, una caliente) en 1'000.000 de generaciones con muestreos cada 100 generaciones para un total de 10.000 árboles.

La convergencia de los parámetros estadísticos se determinó usando el programa Tracer 1.6 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>). Se descartaron 2.000 generaciones y los valores de probabilidades *a posteriori* se obtuvieron a partir de los 32.000 árboles resultantes.

La inferencia filogenética se hizo con el programa MEGA 6.0 (22) mediante los métodos de *neighbor-joining*, el modelo de sustitución de nucleótidos Kimura 2, parámetros con 1.000 réplicas *bootstrap* de máxima verosimilitud, y el modelo de sustitución de nucleótidos GTR con 1.000 réplicas *bootstrap*.

Los árboles de consenso se visualizaron mediante el programa FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) y se editaron en el programa MEGA 6.0 (22).

Análisis de diversidad genética y evolución adaptativa

Se estimaron las distancias genéticas dentro del genotipo, entre genotipos y para el grupo representado por las secuencias obtenidas en el estudio utilizando el modelo evolutivo Kimura 2 y los parámetros en el programa MEGA 6.0 (22).

Con el fin de establecer las posibles fuerzas que han moldeado la evolución del virus, se hizo un primer análisis utilizando diferentes pruebas de neutralidad: la prueba estadística D de Tajima (23) y los tests F* y D* de Fu y Li (24) utilizando el programa DnaSP, versión 5.10.01 (25).

Para determinar los codones específicos de la secuencia que podrían estar sujetos a selección, se analizó la matriz por medio del servidor Datamonkey (<http://www.datamonkey.org>) (26).

Se determinó la razón del número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo sobre el número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (*divergence at nonsynonymous and synonymous sites*, dN/dS).

En todos los análisis se usó el modelo de sustitución GTR (*generalised time reversible*) y un nivel de significación de $p < 0,1$. Se seleccionaron los sitios que presentaron significación estadística mediante los métodos de máxima verosimilitud de probabilidad de efectos fijos (*Fixed Effects Likelihood*, FEL), de probabilidad interna de efectos fijos (*Internal FEL*, IFEL) y de *single likelihood ancestor counting* (SLAC).

Resultados

El virus del chikungunya en Colombia

En Colombia hubo varias alertas por casos importados del virus del chikungunya antes del reporte de los primeros casos autóctonos en el departamento de Bolívar, en septiembre de 2014 (27). Después de su establecimiento, el virus ha tenido un comportamiento epidémico durante el

periodo 2014-2015 (figura 1), y logró colonizar una gran proporción de los municipios con presencia del vector *A. aegypti* (figura 2).

Circulación del genotipo de Asia del virus del chikungunya en Colombia

En el presente estudio se secuenció el gen *E1* completo en un total de 29 sueros o sobrenadantes de cultivo celular provenientes de 17 departamentos colombianos (cuadro 2), es decir, 53 % de los departamentos con reporte de casos confirmados de la enfermedad.

Las topologías obtenidas mediante inferencia bayesiana (figura 3) y los métodos de máxima verosimilitud y de *neighbor joining* (archivos complementarios 1 y 2, disponibles en: doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2990>), evidenciaron concordancia en los soportes *bootstrap* (mayores de 85 %) para las ramas correspondientes a los genotipos y los principales linajes dentro de cada genotipo. Las secuencias colombianas mostraron una estrecha relación filogenética con cepas del genotipo de Asia provenientes de la isla Saint Martin, las Islas Vírgenes, México y Brasil.

Diversidad genética y evolución adaptativa

Al estimar la diversidad genética, se evidenció un promedio de 0,001 sustituciones de bases por sitio entre cada par de secuencias colombianas del virus y las secuencias reportadas en el continente americano (Saint Martin, Islas Vírgenes, Brasil, México), con una identidad de 99,7 a 99,9 % a nivel de nucleótidos y de 99,9 % a nivel de aminoácidos. Entre las secuencias colombianas y las demás secuencias pertenecientes al genotipo de Asia se estimó un promedio de 0,005 sustituciones de bases por sitio entre cada par de secuencias.

En los análisis de evolución adaptativa, las pruebas estadísticas de neutralidad presentaron las siguientes estimaciones: en la D de Tajima, -0,28665 ($p > 0,10$, no significativo), y en el test D* de Fu y Li, 0,93863 ($p > 0,10$, no significativo) y en el test F*, 0,52645 ($p > 0,1$, no significativo). El valor global de dN/dS fue 0,0517; el codón 145 fue el único seleccionado positivamente mediante los métodos FEL e IFEL, con un valor de 0,053 ($p < 0,1$, significativo). Mediante los métodos SLAC, FEL e IFEL ($p < 0,1$), se demostró la existencia de un gran número de codones sometidos a una fuerte selección negativa (cuadro 3).

**Casos acumulados de fiebre
Colombia, 2014-2015**

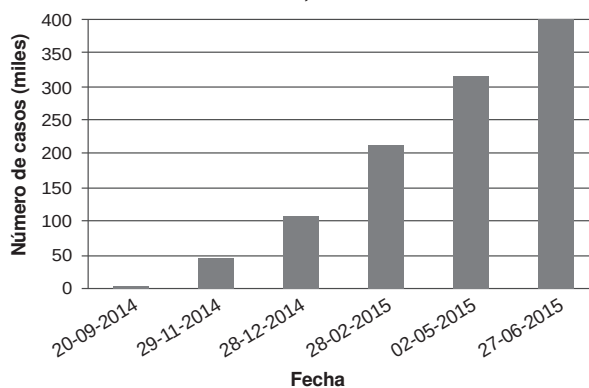


Figura 1. Casos acumulados de fiebre del chikungunya, Colombia, 2014-2015

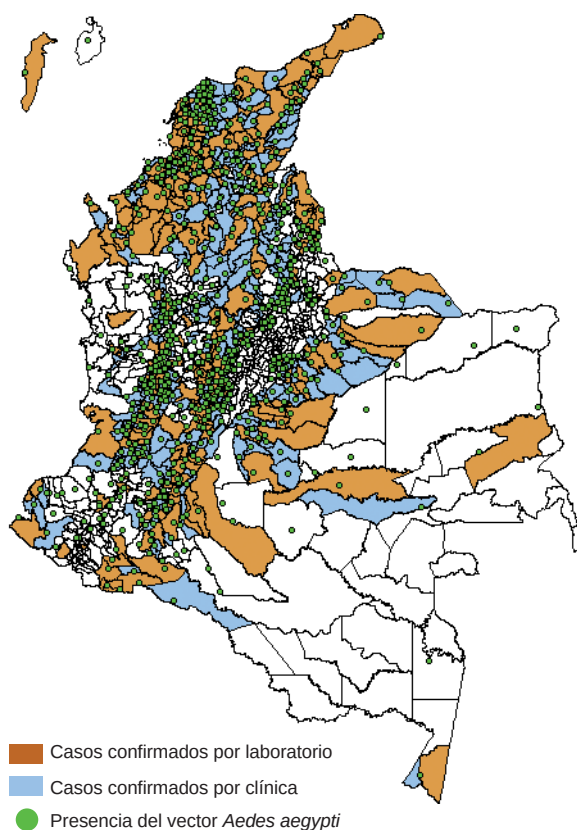


Figura 2. Distribución municipal de *Aedes aegypti* y casos confirmados de fiebre del chikungunya durante el 2015

Discusión

Desde la confirmación de la circulación autóctona del virus de chikungunya en septiembre de 2014, su transmisión en Colombia ha mostrado un patrón epidémico en el cual han contribuido de forma determinante diversos factores. En primer lugar,

Cuadro 2. Secuencias del virus del chikungunya, Colombia, 2014-2015

Identificación	Localización (departamento, municipio)	Año	Número de acceso en el Genbank
440191	Tolima, Purificación	2015	KT211023
441200	Tolima, Armero-Guayabal	2015	KT211024
433676	Bolívar, Mahates	2014	KT211025
440252	Tolima, Armero-Guayabal	2015	KT211026
440417	Tolima, Guamo	2015	KT211028
440164	Tolima, Armero-Guayabal	2015	KT211029
439609	Huila, Neiva	2015	KT211030
439930	La Guajira, Barrancas	2015	KT211031
439933	La Guajira, Manaure	2015	KT211032
440324	Norte de Santander, Cúcuta	2015	KT211027
439690	Norte de Santander, Cúcuta	2015	KT211033
91-3	Arauca, Arauca	2014	KT211034
92-46	San Andrés, San Andrés	2014	KT211035
92-20	Magdalena, Santa Marta	2014	KT211036
91-8	Boyacá, San Luis de Gaceno	2014	KT211037
91-11	Boyacá, Soata	2014	KT211038
91-19	Cundinamarca, La Mesa	2014	KT211039
92-31	Magdalena, Santa Marta	2014	KT211040
93-44	La Guajira, Barrancas	2014	KT211041
986333	Guaviare, San José	2015	KT211042
433717	Bolívar, San Juan Nepomuceno	2014	KT211043
435088	Córdoba, Moñitos	2014	KT211044
435432	Cesar, Valledupar	2014	KT211045
434965	Sucre, Sincelejo	2014	KT211046
441578	Valle, La Unión	2015	KT211047
442892	Guainía, Puerto Inírida	2015	KT211048
442205	Chocó, El Cantón de San Pablo	2015	KT211049
441519	Valle, Cali	2015	KT211050
442891	Guainía, Puerto Inírida	2015	KT211051

Para cada virus se muestra el código interno, así como su procedencia geográfica (municipio y departamento), el mes y año de recolección y el número de registro en el Genbank.

el virus encontró una población completamente vulnerable ante la infección, sin historia de retos previos frente a este virus o cualquier otro estrechamente relacionado. Al igual que el virus Mayaro detectado en Colombia hace más de 50 años (28), el virus del chikungunya pertenece al complejo del virus del bosque de Semliki (29).

Otros alfavirus que han circulado en las últimas décadas en Colombia, como el virus de la encefalitis equina venezolana y el virus de la encefalitis equina del este, pertenecen a otros serocomplejos y su incidencia en el humano ha sido limitada a nivel geográfico (30), por lo que es improbable que confieran inmunidad cruzada frente al virus del chikungunya. En segundo lugar, el virus encontró una alta densidad y una amplia distribución del mosquito vector *A. aegypti* doméstico, lo cual le permitió completar su ciclo de transmisión de forma eficiente e invadir rápidamente los 33 departamentos, ocasionando un aumento exponencial de los casos de fiebre del chikungunya durante el 2014 y el primer semestre del 2015 (31,32).

A nivel filogenético, las secuencias de las cepas colombianas mostraron una estrecha relación con las secuencias de cepas de la Isla Saint Martin, de Islas Vírgenes y de las otras reportadas en la región de las Américas, las cuales pertenecen al genotipo de Asia, y cuya dinámica de dispersión espacial y temporal a través de las islas del Caribe, de Centroamérica y de Suramérica sugiere la presencia exclusiva de dicho genotipo en la región. Recientemente se reportó la presencia del genotipo ECSA en Brasil (17), sin embargo, su impacto a nivel epidemiológico solo podrá determinarse en la medida en que se conozcan los resultados de otros estudios moleculares realizados en los diversos países de la región.

A pesar de que se espera un incremento en la diversidad genética de las cepas que circulan en la región debido a las múltiples rondas de replicación y a la alta tasa de error reportada para este virus (15), la posibilidad de rastrear el origen reciente de las cepas que hayan ingresado y se hayan diseminado por el territorio nacional se ve limitada

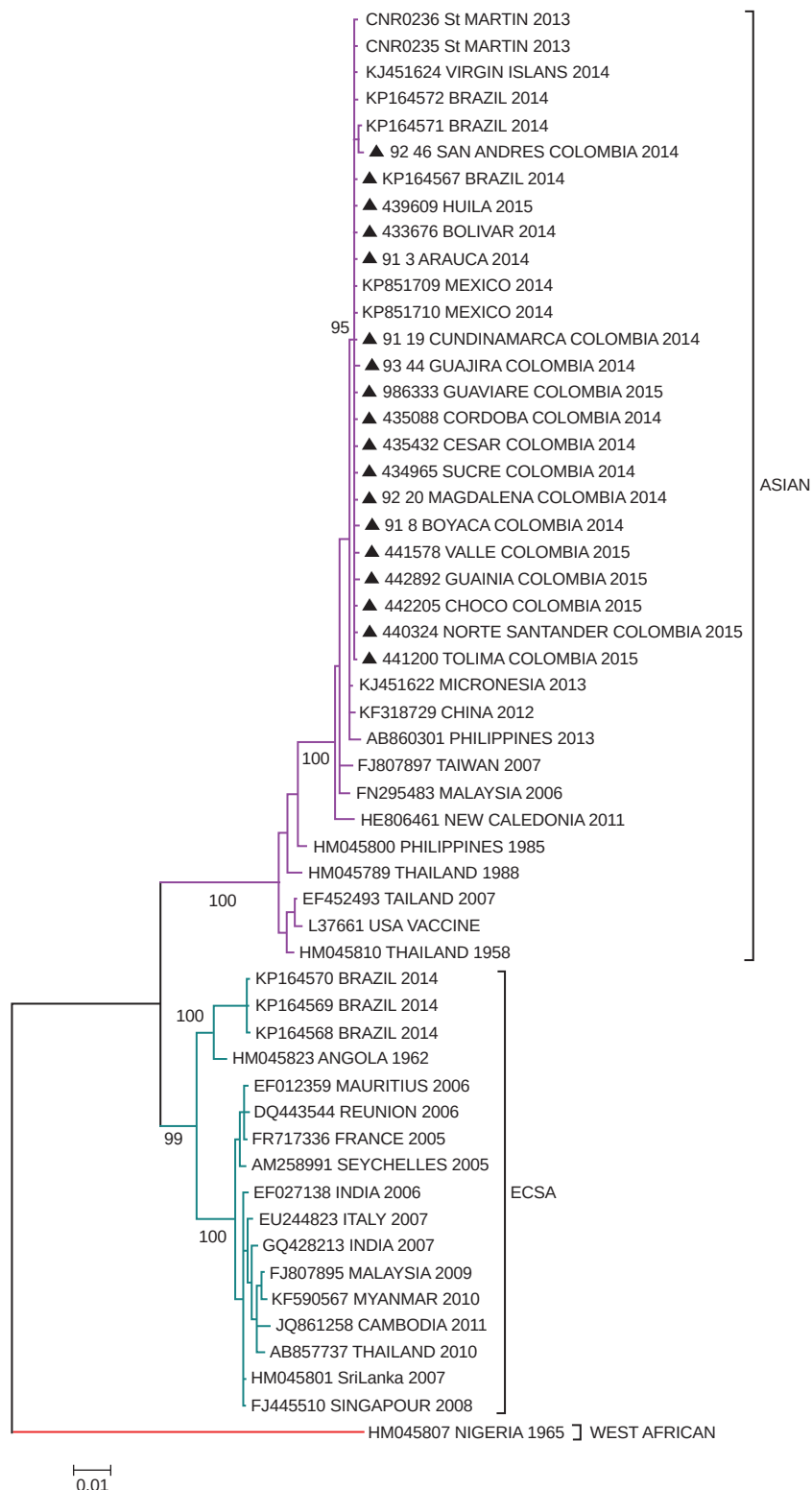


Figura 3. Filogenia del virus del chikungunya establecida mediante inferencia bayesiana con base en el gen *E1*. Se reconstruyó el árbol con el modelo de sustitución de nucleótidos GTR. Se muestran los valores de probabilidad posterior ≥ 90 . Como grupo externo se incluyó el genotipo WA por ser el más divergente en estudios previos. Los triángulos negros representan las cepas colombianas secuenciadas en el presente estudio. Teniendo en cuenta la alta identidad de las secuencias obtenidas, se incluyó una cepa por cada departamento.

Cuadro 3. Codones sujetos a selección negativa obtenidos por el método FEL

Codón	p<0,1	Codón	p<0,1	Codón	p<0,1	Codón	p<0,1
20	0,013	121	0,003	230	0,030	360	0,004
35	0,001	122	0,011	240	0,038	365	0,019
37	0,011	124	0,017	253	0,003	370	0,060
39	0,022	128	0,001	270	0,035	381	0,003
41	0,002	162	0,035	287	0,020	394	0,058
61	0,015	173	0,019	298	0,014	402	0,013
87	0,018	185	0,070	308	0,053	421	0,010
100	0,005	202	0,081	315	0,001	427	0,003
107	0,010	216	0,035	331	0,042	436	0,031

por el bajo número de secuencias genómicas del virus disponibles hasta la fecha y responsables de los brotes o epidemias en los países de la región (33,34), así como por la gran estabilidad del genotipo, reflejada en un alto porcentaje de identidad entre las secuencias de las cepas provenientes de diferentes países de la región.

En el análisis de evolución adaptativa, aunque los valores obtenidos por las pruebas de neutralidad a nivel global (longitud total) para la región genómica analizada sugieren la ausencia de selección natural, la relación entre los dN y los dS y un análisis más sólido de los codones mediante los métodos FEL, IFEL y SLAC, demostraron la existencia de una fuerte selección purificadora para el gen *E1*. La existencia de selección purificadora se sustenta en estudios con otros virus transmitidos por vectores artrópodos, en los cuales se ha demostrado la existencia de compromisos (*trade offs*) en su evolución, debido a que durante el ciclo de trasmisión deben preservar la función proteica que les permita replicarse en dos huéspedes filogenéticamente distantes (artrópodo y vertebrado) (33,35). Estos compromisos, con un efecto directo en la eficacia biológica (*fitness* viral), comúnmente resultan en la eliminación de gran parte de la variabilidad a largo plazo y, por ende, en una mayor estabilidad genética, lo cual se ve reflejado en la poca acumulación de mutaciones en el gen *E1* de las cepas que circulan en las Américas, a pesar de haber alcanzado poblaciones de gran tamaño y ser responsable de múltiples brotes epidémicos.

Durante la epidemia de 2005 a 2006 ocasionada por el genotipo ECSA del virus del chikungunya en la isla La Reunión, se encontró la sustitución A226V localizada en la proteína E1 y se la relacionó con la capacidad del virus de infectar y replicarse en el vector *Aedes albopictus* (34,36,37); sin embargo,

esta sustitución no se ha encontrado en cepas pertenecientes al genotipo de Asia ni tampoco se evidenció en las secuencias colombianas analizadas. En el presente estudio la secuencia 93-44_Guajira_2014 presentó la sustitución de aminoácido T155I, la cual no se ha asociado al comportamiento epidemiológico o a la virulencia.

Considerando la presencia en el país de *A. aegypti* y de *A. albopictus* y la circulación simultánea de los genotipos de Asia y ECSA del virus del chikungunya en un país vecino (Brasil), es necesario establecer una vigilancia de genotipos, con el fin de detectar la potencial introducción de un nuevo genotipo, su interacción con el genotipo existente y su contribución a la transmisibilidad o virulencia del virus.

Se concluye que el patrón de dispersión del virus del chikungunya fue de alcance epidémico en Colombia, debido a la amplia distribución del vector *A. aegypti* y a la presencia de una población vulnerable ante la infección. Además, se identificó el genotipo de Asia como el único presente en la muestra de estudio, lo cual sugiere que ha sido el predominante, si no el único, durante la epidemia en el país. Asimismo, los patrones de diversidad genética y evolución adaptativa indican que el gen *E1* está sometido a una fuerte selección purificadora.

Los datos presentados en el presente manuscrito son los primeros sobre la caracterización genética del virus del chikungunya en Colombia, y su importancia para la salud pública es enorme, ya que nunca antes había habido transmisión de este virus en el país y, seguramente, la enfermedad se hará endémica. Por ello, es necesario continuar con la vigilancia de los genotipos del virus, con el fin de detectar posibles cambios en su epidemiología, su eficacia viral (*fitness*), su habilidad para colonizar nuevos vectores y su patogenicidad.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a las secretarías y laboratorios departamentales de salud pública por la recolección y el envío de las muestras al Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud. Igualmente, los autores desean agradecer a Martha González Pinilla del Grupo de Virología, por los aislamientos virales. J. A. Usme-Ciro fue beneficiario del Programa de Doctorados Nacionales de Colciencias.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no tienen conflicto de intereses con respecto al manuscrito.

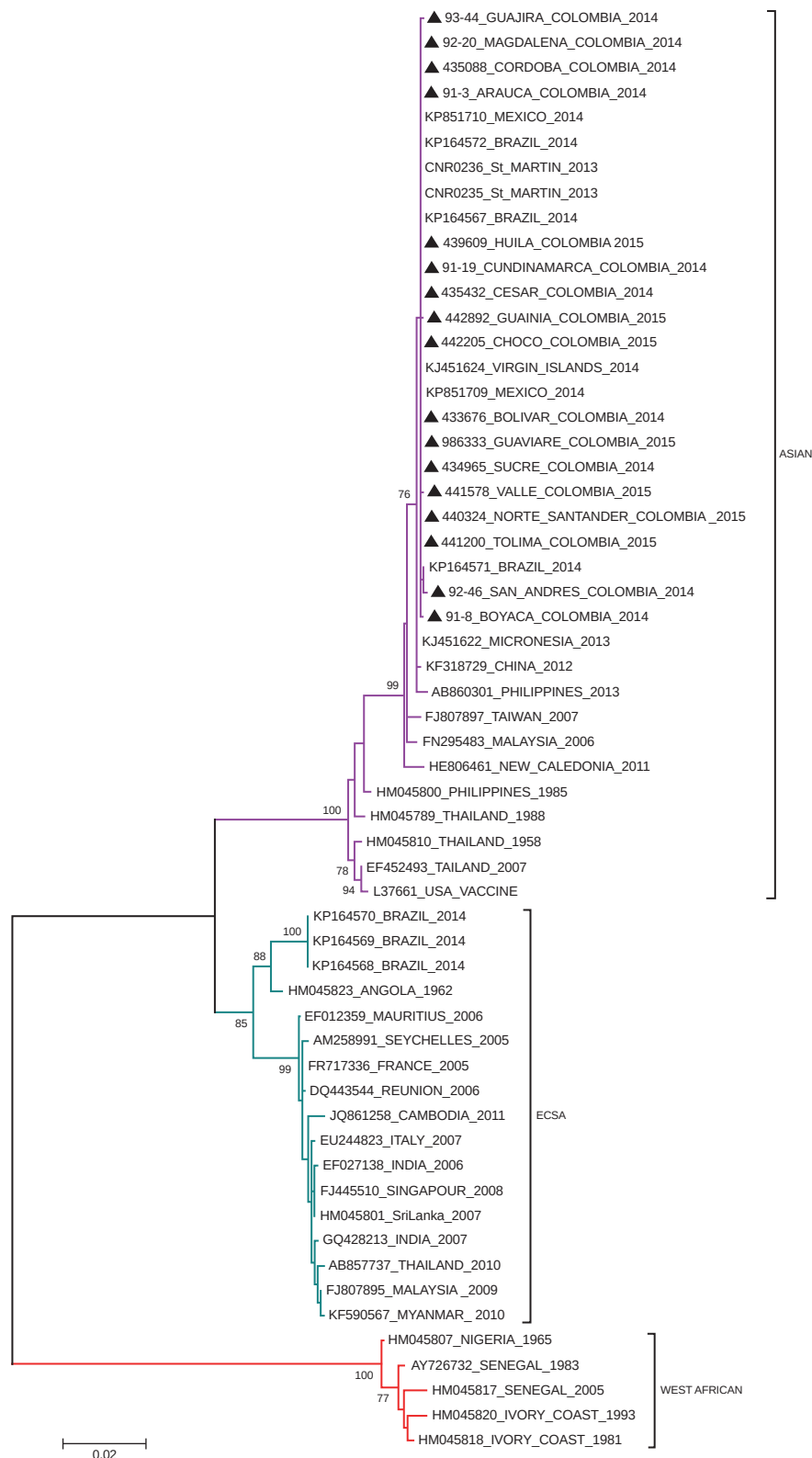
Financiación

Este estudio fue financiado por la Dirección de Redes en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

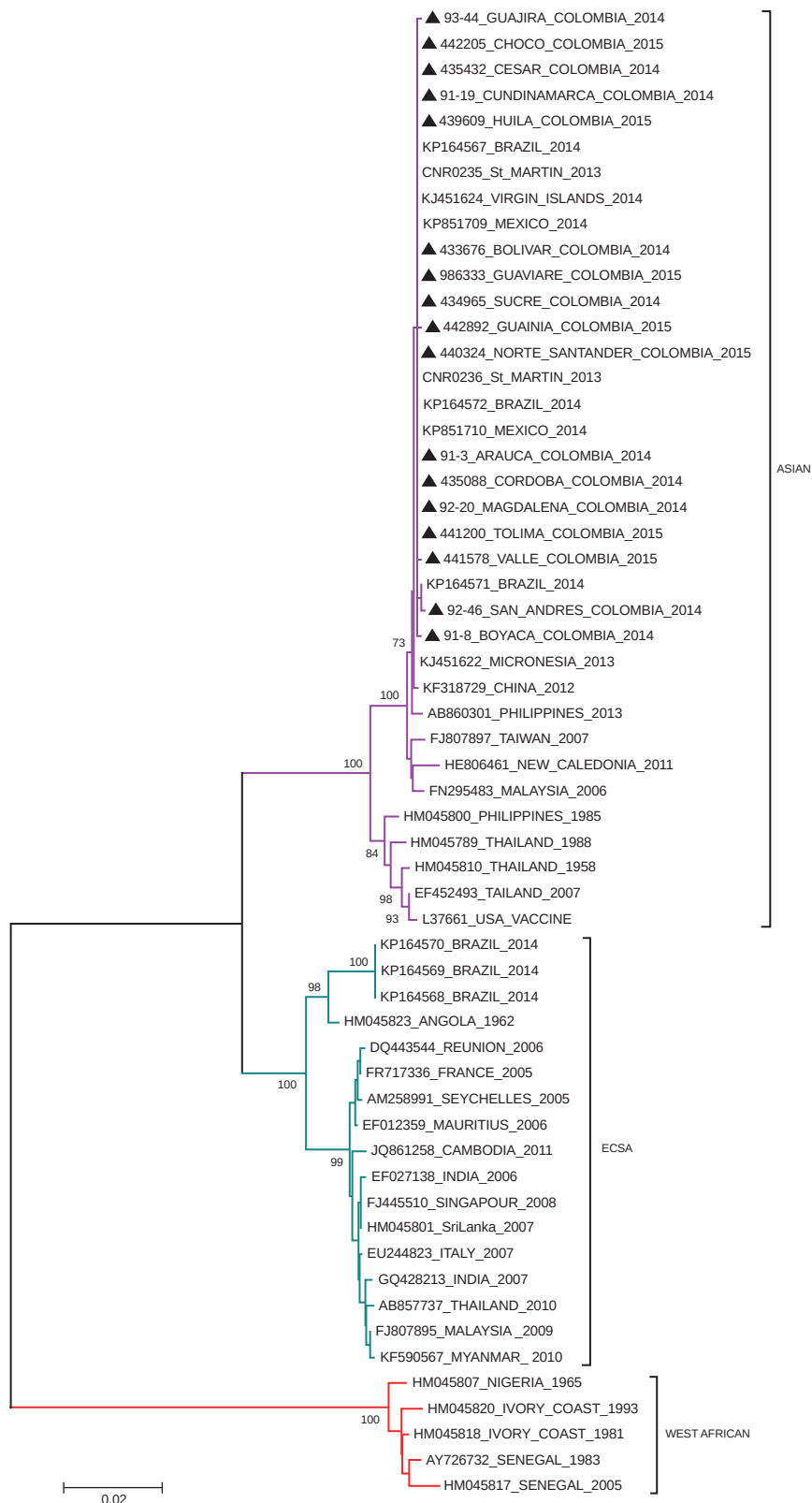
Referencias

- Powers AM.** Chikungunya. *Clin Lab Med.* 2010;30:209-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.003>
- Knipe D, Howley P.** *Field's Virology.* Sixth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 651-86.
- Ross RW.** The Newala epidemic. III. The virus: Isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg (Lond).* 1956;54:177-91.
- Dupuis-Maguiraga L, Noret M, Brun S, Le Grand R, Gras G, Roques P.** Chikungunya disease: Infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1446. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001446>
- Rougeron V, Sam IC, Caron M, Nkoghe D, Leroy E, Roques P.** Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. *J Clin Virol.* 2015;64:144-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.032>
- Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT.** Chikungunya: A re-emerging virus. *Lancet.* 2012;379:662-71. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)60281-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(11)60281-x)
- Weaver SC.** Arrival of chikungunya virus in the new world: Prospects for spread and impact on public health. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e2921. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002921>
- Mowatt L, Jackson ST.** Chikungunya in the Caribbean: An epidemic in the making. *Infect Dis Ther.* 2014;3:63-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s40121-014-0043-9>
- Morrison TE.** Reemergence of chikungunya virus. *J Virol.* 2014;88:11644-7. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01432-14>
- Instituto Nacional de Salud.** Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 25 de 2015. Fecha de consulta: 15 de julio de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Paginas/default.aspx>
- Lo Presti A, Lai A, Cella E, Zehender G, Ciccozzi M.** Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. *Asian Pac J Trop Med.* 2014;7:925-32. [http://dx.doi.org/10.1016/s1995-7645\(14\)60164-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1995-7645(14)60164-4)
- Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC.** Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: Evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol.* 2000;81:471-9. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-471>
- Tsatsarkin KA, Chen R, Sherman MB, Weaver SC.** Chikungunya virus: Evolution and genetic determinants of emergence. *Curr Opin Virol.* 2011;1:310-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2011.07.004>
- Volk SM, Chen R, Tsatsarkin KA, Adams AP, García TI, Sall AA, et al.** Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J Virol.* 2010;84:6497-504. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01603-09>
- Lo Presti A, Ciccozzi M, Cella E, Lai A, Simonetti FR, Galli M, et al.** Origin, evolution, and phylogeography of recent epidemic CHIKV strains. *Infect Genet Evol.* 2012;12:392-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.015>
- Leparc-Goffart I, Nougaiède A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X.** Chikungunya in the Americas. *Lancet.* 2014;383:514. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)60185-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(14)60185-9)
- Nunes MR, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, de Oliveira LF, et al.** Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.* 2015;13:102. <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x>
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Vézé JO, Lambert AJ, et al.** Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:764-7. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1305.070015>
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al.** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007;23(21):2947-8. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D.** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods.* 9. United States 2012. p. 772. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Huelsenbeck JP, Ronquist F.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 2001;17(8):754-5.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30(12):2725-9. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tajima F.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 1989;123(3):585-95.
- Fu YX, Li WH.** Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics.* 1993;133(3):693-709.
- Librado P, Rozas J.** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009;25(11):1451-2. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Pond SL, Frost SD.** Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics.* 2005;21(10):2531-3. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti320>
- Instituto Nacional de Salud.** IQEN Informe Quincenal Epidemiológico Nacional. Transmisión autóctona de Chikungunya en Colombia. 2014;19:311-38. Fecha de consulta: 6 de julio de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/iqen/Paginas/default.aspx>
- Groot H.** Estudio sobre virus transmitidos por artrópodos en Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.* 1964;12:197-217.
- Powers AM, Brault AC, Shirako Y, Strauss EG, Kang W, Strauss JH, et al.** Evolutionary relationships and systematics of the Alphaviruses. *J Virol.* 2001;75:10118-31. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.75.21.10118-10131.2001>
- Mesa F, Cárdenas J, Villamil L.** Las encefalitis equinas en la salud pública. Bogotá: UNAL; 2005. p. 1-124.

31. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 19 de 2015. Fecha de consulta: 15 de julio de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Paginas/default.aspx>.
32. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín epidemiológico semanal. 2014 - 2015. Fecha de consulta: 15 de julio de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Paginas/default.aspx>.
33. **Weaver SC, Rico-Hesse R, Scott TW.** Genetic diversity and slow rates of evolution in New World alphaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992;176:99-117.
34. **Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S.** A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 2007;3:e201. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>
35. **Weaver SC, Brault AC, Kang W, Holland JJ.** Genetic and fitness changes accompanying adaptation of an arbovirus to vertebrate and invertebrate cells. *J Virol.* 1999;73:4316-26.
36. **Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, *et al.*** Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* 2006;3:e263. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0030263>
37. **Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, *et al.*** Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Réunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One.* 2007;2:e1168. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001168>



Archivo complementario 1. Inferencia filogenética por máxima verosimilitud del virus del chikungunya basada en el gen *E1*. Se reconstruyó el árbol mediante el método de ML con 1.000 réplicas *bootstrap* y el modelo de sustitución de nucleótidos GTR. El genotipo WA se utilizó como grupo externo solo con fines de visualización. Los triángulos negros representan las cepas colombianas secuenciadas en el presente estudio.



Archivo complementario 2. Inferencia filogenética del virus del chikungunya por *neighbor-joining* basada en el gen *E1*. Se utilizaron 1.000 réplicas *bootstrap* y el modelo de sustitución de nucleótidos Kimura 2. El genotipo WA se utilizó como grupo externo solo con fines de visualización. Los triángulos negros representan las cepas colombianas secuenciadas en el presente estudio.

ARTÍCULO ORIGINAL

Diagnóstico diferencial de dengue y chikungunya en pacientes pediátricos

Eliana Patricia Calvo¹, Carolina Coronel-Ruiz¹, Syrley Velazco²,
Myriam Velandia-Romero¹, Jaime E. Castellanos¹

¹ Laboratorio de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

² Hospital Universitario de La Samaritana, Unidad Funcional Girardot, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Las infecciones por el virus del dengue y del chikungunya presentan síntomas clínicos similares, lo cual dificulta el diagnóstico clínico. Además, son transmitidas por los mismos vectores, por lo que en una región puede haber circulación e infección simultánea con los dos virus. Los resultados de cada enfermedad, no obstante, son diferentes: la fiebre del chikungunya rara vez es fatal, pero puede dejar secuelas de tipo articular y neurológico, en tanto que el dengue es potencialmente fatal. De ahí la importancia de un diagnóstico preciso y oportuno.

Objetivo. Comparar el diagnóstico presuntivo basado en los hallazgos clínicos con el diagnóstico diferencial hecho mediante pruebas de laboratorio.

Materiales y métodos. Se utilizaron pruebas virológicas y serológicas específicas para dengue y chikungunya en ocho muestras de sangre de pacientes pediátricos con síndrome febril. Se empleó la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa para detectar los virus del dengue y del chikungunya y el método de ELISA basado en la captura de IgM para confirmar los casos de dengue.

Resultados. Con base en los hallazgos clínicos, dos pacientes se clasificaron como casos probables de dengue o chikungunya, dos como casos probables de chikungunya y en cuatro no hubo diagnóstico presuntivo de infección viral. Las pruebas de laboratorio confirmaron la infección por el virus del dengue en dos pacientes, por el virus del chikungunya en otros dos e infección simultánea de dengue y chikungunya en los cuatro restantes.

Conclusión. Los hallazgos clínicos no fueron suficientes para hacer un diagnóstico en pacientes pediátricos con síndrome febril, por lo cual se requirieron pruebas específicas de laboratorio para establecer con precisión el agente etiológico causante de la enfermedad.

Palabras clave: arbovirus, dengue, virus del chikungunya, coinfección, fiebre, diagnóstico, recién nacido.
doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2982>

Dengue and Chikungunya differential diagnosis in pediatric patients

Introduction: Dengue and Chikungunya infections have similar clinical symptoms, which makes their clinical diagnosis complex. Moreover, both are transmitted by the same mosquito vectors, which results in virus co-circulation and co-infection. However, the outcome of these diseases differs: Chikungunya fever is rarely fatal but can have permanent and severe rheumatic and neurological sequelae, whereas dengue disease is potentially fatal. Thus, accurate diagnosis is critical.

Objective: To compare presumptive diagnoses based on clinical findings with the differential diagnoses based on specific laboratory tests for each virus.

Materials and methods: We performed specific virological and serological tests for both dengue and Chikungunya infections on eight acute-phase blood samples collected from pediatric patients with febrile syndrome. We used RT-PCR to detect dengue and Chikungunya virus, and IgM-capture ELISA to confirm infection by dengue virus.

Results: Based on clinical findings, two patients were diagnosed as probable cases of dengue or Chikungunya, and two were diagnosed as probable cases of chikungunya. Four had no presumptive diagnosis of viral infection. Laboratory tests confirmed dengue infection in two patients, Chikungunya infection in two patients, and co-infection by the two viruses in the other four patients.

Contribución de los autores:

Eliana Patricia Calvo y Jaime E. Castellanos: concepción del estudio, análisis e interpretación de los datos

Eliana Patricia Calvo y Carolina Coronel-Ruiz: ensayos de laboratorio

Carolina Coronel-Ruiz y Myriam Velandia-Romero: análisis e interpretación de los datos

Syrley Velazco: revisión de historias clínicas

Eliana Patricia Calvo: escritura del documento

Todos los autores leyeron, revisaron y aprobaron el documento.

Conclusion: Clinical findings were not sufficient to make a diagnosis in pediatric patients with febrile syndrome; specific laboratory tests were required to establish the etiologic agent of the disease.

Key words: Arboviruses, dengue, Chikungunya virus, coinfection, fever, diagnosis, infant, newborn.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2982>

Las enfermedades causadas por los virus transmitidos por artrópodos hematófagos, o arbovirus, constituyen uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo. Los arbovirus se encuentran principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, y en la mayoría de los casos causan infecciones subclínicas, también denominadas fiebres inespecíficas (1,2).

El virus del chikungunya (CHIKV) y el virus del dengue (DENV) son los arbovirus que tienen mayor impacto en la salud en las Américas, especialmente en Colombia (3-7). El CHIKV pertenece al género *Alfavirus*, familia *Togaviridae*, mientras que el DENV pertenece al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. Los dos tienen un genoma de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva y ambos son transmitidos por los mismos vectores, los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (2).

Los síntomas típicos causados por estos dos arbovirus incluyen fiebre, erupciones cutáneas, dolor muscular y articular, náuseas, dolor de cabeza y vómito, razón por la cual en algunas ocasiones las infecciones son clínicamente indistinguibles. Sin embargo, el resultado de cada enfermedad es diferente: la fiebre del chikungunya rara vez es fatal, pero puede dejar importantes secuelas de tipo articular y neurológico (8), en tanto que el dengue es potencialmente fatal (7). La infección con cualquiera de los cuatro serotipos del DENV produce un amplio espectro de manifestaciones clínicas que incluyen los cuadros clínicos con síntomas leves (denominados fiebre de dengue sin signos de alarma), otros con signos más evidentes (dengue con signos de alarma) y cuadros clínicos más graves (dengue grave), los cuales pueden tener un desenlace fatal (9). La infección con uno de los cuatro serotipos de DENV provoca una reacción inmunitaria que otorga protección de por vida contra nuevas infecciones con el mismo

serotipo, pero puede potenciar la infección con otros serotipos y aumentar la probabilidad de desarrollar dengue con signos de alarma y dengue grave durante infecciones secundarias.

En las Américas, la circulación del DENV data de la década de los 80; desde entonces se ha extendido a cerca de 40 países de la zona (10). En Colombia, el número de casos ha crecido de manera importante en las últimas décadas y se caracteriza por brotes epidémicos cada tres o cuatro años (7,11). En el 2010, se presentó la epidemia más grande de los últimos años: se notificaron 157.152 casos, de los cuales 9.482 (6 %) correspondieron a dengue grave (11). Aunque en los años siguientes el número de casos disminuyó hasta menos de 60.000, en 2013 y 2014 volvió a superar los 100.000 y hasta la semana 38 de 2015 se habían reportado 67.384 casos (3,12).

En cuanto al CHIKV, el primer brote epidémico de la enfermedad en las Américas se reportó a finales del 2013 en la isla Saint Martin; desde entonces, la transmisión en la región ha ido en aumento y se ha extendido a 44 países y territorios. En estos dos años se han reportado cerca de 1,2 millones de casos sospechosos y 225 muertes (13). Hasta la semana epidemiológica 38 de 2015, se habían reportado 568.614 casos sospechosos, de los cuales 22.920 se confirmaron por laboratorio y 62 terminaron en muerte. En Colombia se han reportado 333.173 casos, de los cuales solo 1.961 se confirmaron por laboratorio y 55 fueron fatales (13). Cabe destacar que, desde la introducción del virus a mediados de 2014 hasta el momento, Colombia es el país con el mayor número de casos y de muertes reportadas (88 %) en las Américas (4,6,13).

Dado que los síntomas de la infección por el CHIKV son similares a los causados por el DENV, es posible que en las zonas donde el dengue es endémico el número de casos y de infecciones simultáneas se haya subestimado, o que los casos hayan pasado inadvertidos.

El diagnóstico clínico de estas arbovirosis en los primeros días de evolución es complejo, ya que presentan un cuadro febril agudo con síntomas

Correspondencia:

Eliana Patricia Calvo, Laboratorio de Virología, Universidad El Bosque, Avenida Carrera 9 N° 131A-02, edificio D, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: (571) 648 9000, extensión 1209; Fax: (571) 648 9066
calvoeliana@unbosque.edu.co

Recibido: 23/07/15; aceptado: 22/10/15

inespecíficos que pueden confundirse con otras infecciones, como influenza, rubéola, gastroenteritis, fiebre tifoidea, fiebre amarilla y leptospirosis. Aunque existen varias pruebas virológicas (aislamiento viral, detección de antígeno NS1 o detección del ARN) y serológicas (presencia de IgM o IgG específicos) para la confirmación del diagnóstico de la infección por el DENV, en Colombia se utilizan principalmente en la investigación y en la vigilancia (14). En el caso del CHIKV, el diagnóstico se hace con base en el conjunto de manifestaciones clínicas, en tanto que la detección de ARN viral por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcriptasa inversa y la detección de IgM se usan principalmente para la investigación y la vigilancia (3,4,6).

En el presente trabajo se evaluaron pacientes pediátricos con síndrome febril para comparar el diagnóstico presuntivo basado en los hallazgos clínicos con el diagnóstico diferencial basado en pruebas específicas de laboratorio. Se evidenció que el uso de los hallazgos clínicos y paraclínicos no fue suficiente para establecer un diagnóstico preciso y que las pruebas específicas de laboratorio para determinar el agente etiológico causante de la enfermedad son de gran importancia.

Materiales y métodos

Muestras

Se recolectaron de 3 a 5 ml de sangre periférica de ocho pacientes pediátricos ingresados en febrero de 2015 al Hospital Universitario de La Samaritana- Unidad Funcional Girardot por síndrome febril no especificado.

La presente investigación se adelantó en el marco del proyecto “Establecimiento de un algoritmo de laboratorio para la confirmación de casos de dengue en muestras de individuos con síndrome febril atendidos en instituciones de salud de Cundinamarca”, el cual cuenta con el aval del Comité de Ética del Centro de Investigación del Hospital y se viene desarrollando en Girardot, una población ubicada en Cundinamarca, a 289 msnm, con temperatura promedio de 29 °C y humedad de 46 %.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: pacientes con síndrome febril de origen incierto de siete días de evolución o menos, cuyos signos y síntomas incluyeran fiebre alta, cefalea, dolor retro-ocular, mialgias, artralgias, postración, hemorragias, edema, exantema, hepatomegalia, esplenomegalia o alteración del estado neurológico.

Revisión de historias clínicas

Se revisaron las historias clínicas de los individuos y la información contenida en ellas se clasificó como hallazgos clínicos, exámenes de laboratorio clínico (hemograma, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial, entre otros) y diagnóstico presuntivo.

Pruebas serológicas

La detección de IgM para el DENV se hizo mediante ELISA con la prueba comercial *UMELISA DENGUE IgM PLUS-Panbio*®, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Pruebas virológicas

La detección de ARN viral se hizo mediante PCR semianidada. Se extrajo ARN a partir de 140 µl de plasma, utilizando el estuche comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit*® (Qiagen) y el protocolo recomendado por el fabricante. La detección de los dos virus se llevó a cabo mediante PCR semianidada (15,16), según el protocolo modificado en el Laboratorio de Virología de la siguiente manera: a partir de 5 µl de ARN y 0,2 µM de oligonucleótidos específicos para cada virus, se llevó a cabo la reacción de transcripción inversa y la amplificación con el sistema *SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq*® (Invitrogen). Luego se tomó 1 µl del producto de la PCR como plantilla para una segunda reacción de amplificación con el sistema *GoTaq*® (Promega). La secuencia de los oligonucleótidos y el programa de amplificación utilizado se especifican en el cuadro 1.

Definición de caso

Se consideró como caso positivo de dengue, el paciente en quien se detectó el virus mediante PCR con transcriptasa inversa o anticuerpos IgM en plasma. El caso positivo de chikungunya se definió como el paciente en quien se detectó el virus mediante PCR con transcriptasa inversa.

Resultados

En el cuadro 2 se presentan los hallazgos clínicos y de laboratorio, así como el diagnóstico en el momento de ingreso de ocho pacientes pediátricos hospitalizados en el Hospital Universitario de La Samaritana, y los resultados de las pruebas de laboratorio específicas para el CHIKV y el DENV.

El grupo de pacientes estaba conformado por cuatro neonatos, dos menores de un año de edad y dos de cuatro y diez años de edad, los cuales

Cuadro 1. Oligonucleótidos y programas de amplificación utilizados

RT-PCR	Oligonucleótidos 5'----3'	Programa de amplificación
DENV	D1 TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG D2 TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC F ACGCAATTGAGCGAAGCAC	Transcripción inversa: a 50 °C durante 30 minutos Desnaturalización inicial: a 95 °C durante 3 minutos Desnaturalización: a 95 °C durante 30 segundos
CHIKV	R CCAAATTGTCCYGGTCTTCCT	Hibridación: 30 ciclos a 55 °C durante 30 segundos Extensión: a 72 °C durante 30 segundos
PCR	Oligonucleótidos 5'----3'	Programa de amplificación
DENV	D1 TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG Ts1 CCCGTAACACTTTGATCGCT Ts2 CGCCACAAGGGCCATGAACAGTTT Ts3 TAACATCATCATGAGACAGAGC Ts4 TTCTCCCGTTCAGGATGTTC F ACGCAATTGAGCGAAGCAC	Desnaturalización inicial: a 95 °C durante 3 minutos Desnaturalización: a 95 °C durante 30 segundos Hibridación: 25 ciclos a 55 °C durante 30 segundos Extensión: a 72 °C durante 30 segundos
CHIKV	R2 CTGAAGACATTGGCCCCAC	

DENV: virus del dengue; CHIKV: virus del chikungunya; RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

presentaron, además de fiebre, por lo menos un signo o síntoma típico de la infección con alguno de estos dos arbovirus. Cuatro de los pacientes fueron diagnosticados en el momento del ingreso como casos sospechosos de chikungunya por presentar erupción cutánea, debilidad e 'hipoactividad' y antecedentes familiares de infección (pacientes identificados con los códigos 371, 267, 958-3 y 986-1). En cuatro de los pacientes no se registró ninguna infección viral como diagnóstico presuntivo, aunque uno de ellos tenía síntomas y antecedentes familiares que sugerían la presencia del CHIKV (caso 511). Dos pacientes fueron diagnosticados como casos sospechosos de dengue (casos 371 y 267) y, aunque en otro paciente los hallazgos clínicos estaban asociados a dengue grave, el caso no se registró como tal (caso 420).

En cuanto a los exámenes de laboratorio, la prueba molecular permitió confirmar la infección por el CHIKV en seis de los pacientes (casos 371, 511, 267, 519, 963 y 986-1) y, con el DENV, en dos (casos 511, 420), en tanto que la detección de anticuerpos IgM para el DENV fue positiva en cinco pacientes (casos 371, 511, 267, 958-3 y 963). Es decir que las pruebas específicas para cada virus permitieron confirmar la infección por arbovirus en todos los pacientes evaluados: dos presentaron infección por el DENV, dos por el CHIKV y cuatro presentaron infección simultánea con los dos virus.

La infección con el DENV se confirmó en un paciente de diez años de edad mediante RT-PCR (caso 420). Este menor presentó signos asociados con dengue grave, como alteración cardiopulmonar, derrame pleural,

hepatomegalia, trombocitopenia y dolor abdominal, por lo cual requirió cuidados intensivos y hospitalización prolongada. El segundo caso correspondió a un neonato de 16 días de edad con IgM positiva (caso 958-3). Con base en el cuadro clínico y los resultados de las pruebas de laboratorio, se concluyó que se trataba de un caso de dengue sin signos de alarma, aunque el diagnóstico presuntivo registrado fue de sepsis neonatal. En este caso no se detectó el CHIKV, pero no se descarta una posible infección simultánea, dado que sus padres y hermanas reportaron que habían presentado los síntomas recientemente.

En el caso 986-1, un paciente de cuatro días de nacido, se detectó únicamente infección por el CHIKV, con signos graves como alteraciones neurológicas y trombocitopenia. En el momento del ingreso, este paciente fue diagnosticado con ictericia fisiológica y sospecha de infección por el CHIKV. No fue posible confirmar que se tratara de transmisión vertical, dado que no se contaba con una muestra de la madre para las pruebas respectivas. El segundo caso correspondió a un niño de cinco meses de edad (caso 519), quien presentó alteraciones neurológicas graves y fue diagnosticado con síndrome convulsivo generalizado; además, se detectó *Streptococcus pneumoniae* en el líquido cefalorraquídeo, lo cual es indicativo de una meningitis bacteriana.

Se confirmaron infecciones simultáneas en cuatro pacientes: dos neonatos, un niño de dos meses y uno de cuatro años. En los casos de los neonatos de siete y cinco días de edad, el diagnóstico presuntivo en el momento del ingreso hospitalario fue de sepsis bacteriana (casos 371 y 511) y,

Cuadro 2. Diagnóstico presuntivo y diagnóstico confirmado. La información contenida en las historias clínicas se clasificó como hallazgos clínicos, hallazgos de laboratorio, observaciones generales y diagnóstico presuntivo. Los resultados de las pruebas serológicas y virológicas se presentan como IgM para dengue y PCR con transcriptasa inversa. Para el diagnóstico confirmado, se tuvieron en cuenta los resultados de las dos pruebas.

Código	Edad	Hallazgos clínicos	Hallazgos paraclínicos	Diagnóstico presuntivo	IgM dengue	PCR con transcriptasa inversa	Diagnóstico confirmado
371	7 días	Erupción cutánea Debilidad Hipoactividad	Hemocultivo: negativo	Sepsis bacteriana Dengue o chikungunya	Positiva	CHIKV: positiva DENV: negativa	Infección simultánea
11	5 días	Erupción cutánea Dificultad respiratoria Hipoactividad Debilidad Disminución del apetito	Radiografía de tórax: aumento en densidad de hilios pulmonares Cambios inflamatorios bronquíticos Sin derrame pleural Sin evidencia de foco bronconeumónico	Sepsis neonatal tardía	Positiva	CHIKV: positiva DENV: positiva para serotipo 1	Infección simultánea
267	2 meses	Dificultad respiratoria: episodio de apnea y cianosis Alteración neurológica Exantema macular generalizado Astenia y adinamia Debilidad Disminución del apetito	Radiografía de tórax: foco bronconeumónico parahiliar bilateral Sin derrame pleural Silueta cardíaca de tamaño normal Transfusión de glóbulos rojos empacados	Broncoaspiración Paro cardíaco revertido Dengue o chikungunya	Positiva	CHIKV: positiva DENV: negativa	Infección simultánea
519	5 meses	Alteración neurológica: somnolencia Convulsiones generalizadas Astenia y adinamia Debilidad Disminución del apetito	TC cerebral sin evidencia de lesión intraaxial o extraaxial Radiografía de tórax: infiltrado en lóbulo medio con consolidación Punción lumbar: cocos Gram positivos en líquido cefalorraquídeo Reacción leucocitaria escasa <i>S. pneumoniae</i> en cultivo en líquido cefalorraquídeo	Síndrome convulsivo generalizado	Negativa	CHIKV: positiva DENV: negativo	Chikungunya
958-3	16 días	Dolor al moverse Exantema macular en abdomen y miembro inferior Alteración neurológica: irritabilidad Hipoactividad Debilidad Disminución del apetito	Hemograma: Hemoglobina: 12.9g/dl Hematocrito: 37,0% Leucocitos: 8.760/mm ³ Plaquetas: 413.000/mm ³	Sepsis neonatal Chikungunya	Positivo	CHIKV: negativa DENV: negativa	Dengue (Probable CHIKV)
963	4 años	Exantema en extremidades Debilidad Astenia y adinamia	Hemograma Hemoglobina: 14.1 g/dl Hematocrito: 41.7% Leucocitos: 4.170/mm ³ Plaquetas: 176.000/mm ³	NR	Positivo	CHIKV: positiva DENV: negativa	Infección simultánea
986-1	4 días	Ictericia Dolor al moverse Alteración neurológica: irritabilidad Erupción cutánea Hipoactividad	Hemocultivo: negativo a los cinco días Hemoglobina: 19.8 g/dl Hematocrito: 55,6% Leucocitos: 9.230/mm ³ Plaquetas: 54.000/mm ³ PCR 15,0 mg/dl Reticulocitos: 2,9 % Bilirrubina total: 14,90 mg/dl Bilirrubina directa: 0,50 mg/dl Bilirrubina indirecta: 14,40 mg/dl	Ictericia fisiológica Chikungunya	Negativo	CHIKV: positiva DENV: negativa	Chikungunya
420	10 años	Dolor osteomuscular Astenia y adinamia Erupción cutánea Alteración cardiopulmonar Derrame pleural Dolor en la palpación abdominal localizado en hipocondrio derecho Hepatomegalia Edema palpebral Petequias	Ecocardiograma: insuficiencia aórtica moderada Leve hipertensión pulmonar Paciente con foco neumónico Hemograma: Hemoglobina: 9,1 g/dl Hematocrito: 27,8 % Leucocitos: 9.100/mm ³ Plaquetas: 88.000/mm ³ Tiempo de protrombina: 11,3 s Tiempo parcial de tromboplastina: 33,2 s Hemocultivos negativos	NR	Negativo	CHIKV: negativa Dengue: positiva para serotipo 2	Dengue

NR: dato no registrado; TC: tomografía computarizada

en uno de ellos (371), se sospechó la presencia de infección por el DENV o el CHIKV debido a los antecedentes familiares. El paciente de dos meses de edad (caso 267), ingresado por broncoaspiración y sospecha de infección por el DENV o el CHIKV, presentó episodios de apnea y requirió asistencia respiratoria mecánica invasiva en la unidad de cuidados intensivos. El paciente de cuatro años (caso 963) presentó síntomas típicos leves, como exantema, debilidad e 'hipoactividad'.

Discusión

Las pruebas específicas de laboratorio permitieron determinar el agente etiológico causante de la enfermedad en los ocho casos de síndrome febril evaluados. En dos de ellos se detectó el DENV, en otros dos, el CHIKV, y en cuatro, infección simultánea con los dos virus. Con base en los hallazgos clínicos y en los antecedentes familiares, dos pacientes fueron diagnosticados como casos probables de dengue, cuatro como casos probables de chikungunya y tres como sepsis neonatal.

Estos resultados evidencian el gran problema de salud que enfrenta la población ubicada en zonas endémicas para dengue con la introducción del CHIKV, así como las dificultades del sistema de salud para dar un diagnóstico correcto y oportuno basado únicamente en la información clínica. Además, se pone de presente la vulnerabilidad de la población pediátrica frente a la infección con los dos arbovirus y a sus implicaciones a largo plazo, así como el subregistro de casos y las infecciones simultáneas.

En este estudio se confirmó la infección por el DENV en seis pacientes; uno de ellos se presentó como dengue grave, tres no presentaron signos de alarma y dos registraron dificultad respiratoria, por lo que se clasificaron como dengue con signos de alarma. Sin embargo, en los casos de infección simultánea con el CHIKV, estas complicaciones no pueden atribuirse con certeza a la infección por el DENV, pues también se han registrado como manifestaciones atípicas de la infección por el CHIKV (17,18). Inicialmente, solo en dos casos se hizo un diagnóstico presuntivo de dengue y el caso de dengue grave no fue reconocido como tal, probablemente, porque no se detectaron anticuerpos IgM para el virus. El diagnóstico correcto de dengue es muy complejo y se dificulta más en áreas donde hay circulación del CHIKV, por lo cual se requieren pruebas específicas de laboratorio que, no solo confirmen la infección con el virus,

sino que permitan detectar tempranamente los casos potencialmente graves. Una rápida confirmación de los casos durante la fase febril es crucial para el manejo adecuado del paciente y para prevenir la propagación de la enfermedad.

Tradicionalmente, la infección por el CHIKV se catalogaba como "benigna" y rara vez resultaba mortal, pero hoy es un problema de salud pública por el dolor incapacitante que produce, las secuelas a largo plazo que se han descrito (artritis, alteraciones neurológicas y sensoriales) y la diversidad de órganos que afecta (17-20). En este estudio se detectó el virus en tres neonatos y tres pacientes pediátricos, algunos de los cuales presentaron complicaciones neurológicas y respiratorias leves, como dificultad para respirar e irritabilidad, y graves, como apnea y síndrome convulsivo, las cuales podrían estar relacionadas con la infección viral (17,21,22). Durante la gran epidemia en la isla de La Réunion entre marzo de 2005 y abril de 2006, se puso en evidencia la asociación entre la infección viral y las complicaciones neurológicas, cardiovasculares, respiratorias, hepáticas y dérmicas, entre otras. Las alteraciones neurológicas se registraron como la principal causa de muerte en individuos con infección grave, y se señaló que los recién nacidos y los ancianos habían sido los más propensos a presentar estas complicaciones (21,22).

El diagnóstico preciso de las infecciones por el CHIKV y el DENV en neonatos, es un desafío imposible de resolver sin pruebas específicas para cada virus. Hay varios reportes de infecciones por dengue y chikungunya en neonatos asociadas con la transmisión vertical, las cuales con frecuencia se confunden con sepsis bacteriana, lo que lleva a la administración innecesaria de antibióticos hasta que el diagnóstico viral se confirma mediante pruebas serológicas o moleculares (23-26). Es posible confirmar la transmisión materna del virus cuando los síntomas en el neonato aparecen antes de cumplir la primera semana y la madre presenta un caso confirmado de infección durante la última semana de embarazo. Este no fue el caso en el presente estudio, ya que no se contaba con las muestras de ninguna de las madres. La transmisión vertical se ha descrito en zonas tropicales donde el dengue es endémico, como el sudeste asiático, India, Brasil, Colombia, Centroamérica y el Caribe (23-26). Los síntomas en los neonatos aparecen hacia el cuarto día de nacidos, y se acompañan principalmente de trombocitopenia y exantema

petequial; aunque la mayoría de los niños se recupera rápidamente, también se han reportado casos de dengue grave e, incluso, de muerte (23-26).

La fiebre del chikungunya neonatal se ha descrito en varios brotes epidémicos en Asia, África, la isla de La Réunion y, recientemente, en el continente americano (27-29). En una serie de ocho casos en Colombia, se observó una alta tasa de letalidad (38 %) y manifestaciones clínicas graves, como complicaciones cardiorrespiratorias, enterocolitis necrosante, miocarditis y meningoencefalitis (27). Las características clínicas frecuentes en los recién nacidos durante la epidemia en India, fueron fiebre, erupción cutánea, episodios de apnea inexplicables e hiperpigmentación difusa (29), mientras que en la isla La Réunion, en 10 de 19 casos de transmisión vertical se produjeron cuadros graves (nueve de edema cerebral y dos de hemorragia cerebral) y cuatro desarrollaron discapacidad persistente (deficiencia ocular y conductual o postural) (30).

El seguimiento de 33 niños infectados al nacer mostró que, a los dos años de edad, 51 % de ellos tenía un retraso en el desarrollo neurológico global en comparación con los no infectados; las habilidades de coordinación y del lenguaje se vieron afectadas con mayor frecuencia que las de movimiento, postura y sociabilidad (31). Esos resultados sugieren que la infección por el CHIKV adquirida en el período perinatal puede ser grave y generar una discapacidad permanente. Por lo tanto, se sugiere hacer el seguimiento de los neonatos infectados con el CHIKV para descartar la aparición de secuelas a largo plazo.

En este estudio se reportan cuatro casos de infección simultánea en pacientes pediátricos, dos de ellos neonatos, lo cual sugiere que hay transmisión vertical de los dos virus. Las infecciones simultáneas por el DENV y el CHIKV no son infrecuentes y se han descrito en zonas donde el dengue es endémico, como India, el sudeste de Asia, África y la isla de San Martín en América. El porcentaje de infección con los dos virus varía entre 3 % (Gabón y San Martín) y 18,2 % en Madagascar durante el brote epidémico del 2006 (32-34); sin embargo, existen pocos registros en pacientes pediátricos y ninguno en neonatos. Durante el brote epidémico del CHIKV de 2008-2009 en Tailandia, se analizó una cohorte de 50 niños menores de 15 años de edad, 32 de los cuales fueron positivos para el CHIKV y diez para el DENV, y solo se detectó una infección simultánea con los dos virus (35), lo cual indicaría

que para este grupo etario la tasa de infección concomitante es baja. No obstante, en otro estudio con cerca de 550 pacientes en la zona este de la India, se encontraron 131 muestras positivas para el CHIKV, 104 para el DENV y 68 infecciones simultáneas, seis de ellas en menores de 15 años, es decir, un porcentaje de 8,8 (36).

En este estudio se documenta la importancia y la urgencia de implementar métodos de diagnóstico de mayor especificidad y sensibilidad que puedan distinguir una infección por el CHIKV de una causada por el DENV, ya que el primero puede producir secuelas neurológicas de consideración y el DENV causa una enfermedad hemorrágica grave. Un diagnóstico adecuado es importante, no solo para el manejo correcto del paciente, el control de la transmisión y la vigilancia epidemiológica, sino también, para obtener información más completa sobre las manifestaciones clínicas de las dos infecciones.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación del Hospital Universitario de La Samaritana, Bogotá, y al Hospital Universitario de La Samaritana-Unidad Funcional Girardot.

Conflicto de intereses

Manifestamos no tener conflictos de intereses con respecto al artículo.

Financiación

Proyecto financiado por el Programa de la Red de Investigación Multidisciplinaria para la prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores, Colciencias, 360-2011.

Referencias

1. **Bolling B, Weaver S, Tesh R, Vasilakis N.** Insect-specific virus discovery: Significance for the arbovirus community. *Viruses*. 2015;7:4911-28. <http://dx.doi.org/10.3390/v7092851>
2. **Rezza G.** Dengue and chikungunya: Long-distance spread and outbreaks in naïve areas. *Pathog Glob Health*. 2014;108:349-55. <http://dx.doi.org/10.1179/2047773214Y.0000000163>
3. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín Epidemiológico Semanal. Sivigila. Semana 38 de 2015. Fecha de consulta: 3 de octubre de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2015%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2038.pdf>
4. **Hoz JM, Bayona B, Vilorio S, Accini JL, Juan-Vergara HS.** Fatal cases of Chikungunya virus infection in Colombia: Diagnostic and treatment challenges. *J Clin Virol*. 2015;69:27-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.05.021>
5. **Mondragón-Cardona AE, Villamil-Gómez WE, Rodríguez-Morales A.** Chikungunya congénito y neonatal: problemas emergentes en pediatría en Latinoamérica. *Pediatr (Asunción)*. 2015;42:149-51. <http://dx.doi.org/10.18004/ped.2015.agosto.149-151>

6. **Cardona-Ospina JA, Henao-San Martín V, Paniz-Mondolfi AE, Rodríguez-MA.** Mortality and fatality due to Chikungunya virus infection in Colombia. *J Clin Virol.* 2015;70:14-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.07.001>
7. **Restrepo AC, Baker P, Clements CA.** National spatial and temporal patterns of notified dengue cases, Colombia 2007-2010. *Trop Med Int Heal.* 2014;19:863-71. <http://dx.doi.org/10.1111/tmi.12325>
8. **Caglioti C, Lalle E, Castilletti C, Carletti F, Capobianchi MR, Bordini L.** Chikungunya virus infection: An overview. *New Microbiol.* 2013;36:211-27.
9. **Horstick O, Jaenisch T, Martínez E, Kroeger A, See LLC, Farrar J, et al.** Comparing the usefulness of the 1997 and 2009 WHO dengue case classification: A systematic literature review. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91:621-34. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.13-0676>
10. **San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckennooghe A, Dayan GH, et al.** The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82:128-35. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0346>
11. **Castrillón JC, Carlos J, Urcuqui S.** Dengue en Colombia: diez años de evolución. *Rev Chil Infectol.* 2015;32:142-9. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182015000300002>
12. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín Epidemiológico Semanal. Siviigila. Semana 53 de 2014. Fecha de consulta: 3 de octubre de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiologico/2014%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2053.pdf>
13. **Organización Panamericana de la Salud.** Número de casos de fiebre Chikungunya en las Américas, 2015. Fecha de consulta: 3 de octubre 3 de 2015. Disponible en: <http://www.paho.org/hq/index.php?itemid=40931>
14. **Castellanos JE, Coronel-Ruiz C.** Dengue disease diagnosis: A puzzle to be solved. *Rev Fac Med.* 2014;62:455-64. <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v62n4.45593>
15. **Chien L, Liao T, Shu P, Gubler DJ, Chang GJ, Huang J.** Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1295-304. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.4.1295-1304.2006>
16. **Pastorino B, Bessaud M, Grandadam M, Murri S, Tolou HJ, Peyrefitte CN.** Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. *J Virol Methods.* 2005;124:65-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.11.002>
17. **Renault P, Solet JL, Sissoko D, Balleydier E, Larrieu S, Filleul L, et al.** A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:727-31.
18. **Her Z, Kam YW, Lin RTP, Ng LF.** Chikungunya: A bending reality. *Microbes Infect.* 2009;11:1165-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.09.004>
19. **Gérardin P, Fianu A, Malvy D, Mussard C, Boussaïd K, Rollot O, et al.** Perceived morbidity and community burden after a Chikungunya outbreak: The TELECHIK survey, a population-based cohort study. *BMC Med.* 2011;9:5. <http://dx.doi.org/10.1186/1741-7015-9-5>
20. **Chopra A, Anuradha V, Lagoo-Joshi V, Kunjir V, Salvi S, Saluja M.** Chikungunya virus aches and pains: An emerging challenge. *Arthritis Rheum.* 2008;58:2921-2. <http://dx.doi.org/10.1002/art.23753>
21. **Economopoulou A, Domínguez M, Helynick B, Sissoko D, Wichmann O, Quenel P, et al.** Atypical Chikungunya virus infections: Clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Reunion. *Epidemiol Infect.* 2009;137:534-41. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268808001167>
22. **Tandale BV, Sathe PS, Arankalle VA, Wadia RS, Kulkarni R, Shah SV, et al.** Systemic involvements and fatalities during Chikungunya epidemic in India, 2006. *J Clin Virol.* 2009;46:145-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2009.06.027>
23. **Choudhry SP, Gupta RK, Kishan J.** Dengue shock syndrome in new born – A case series. *Indian Pediatr.* 2004;41:397-9.
24. **Sirinavin S, Nuntnarumit P, Supapannachart S, Boonkasidecha S, Techasaensiri C, Yoksarn S.** Vertical dengue infection: Case reports and review. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23:1042-7. <http://dx.doi.org/10.1097/01.inf.0000143644.95692.0e>
25. **Maroun SL, Marliere RC, Barcellus RC, Barbosa CN, Ramos JR, Moreira M.** Case report: Vertical dengue infection. *J Pediatr (Rio J).* 2008;84:556-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0021-75572008000700014>
26. **Salgado DM, Rodríguez JA, Lozano LD, Zabaleta TE.** Perinatal dengue. *Biomédica.* 2013;33(Suppl.1):14-21. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.1449>
27. **Villamil-Gómez W, Alba-Silvera L, Menco-Ramos A, González-Vergara A, Molineros-Palacios T, Barrios-Corrales M, et al.** Congenital chikungunya virus infection in Sincelejo, Colombia: A case series. *J Trop Pediatr.* 2015;61:386-92. <http://dx.doi.org/10.1093/tropej/fmv051>
28. **Rolón P, Fonseca R, Genes L, Pereira S, Zapatta L.** Chikungunya adquirida en recién nacidos. Reporte de caso. *Pediatr (Asunción).* 2015;42:42-7. <http://dx.doi.org/10.18004/ped.2015.abril.42-47>
29. **Passi GR, Khan YZ, Chitnis DS.** Chikungunya infection in neonates. *Indian Pediatr.* 2008;45:240-1.
30. **Gérardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, Randrianaivo H, Choker G, et al.** Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. *PLoS Med.* 2008;5:e60. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0050060>
31. **Gérardin P, Sampériz S, Ramful D, Boumahni B, Bintner M, Alessandri J-L, et al.** Neurocognitive outcome of children exposed to perinatal mother-to-child chikungunya virus infection: The CHIMERE Cohort Study on Reunion Island. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e2996. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002996>
32. **Leroy EM, Nkoghe D, Ollomo B, Nze-Nkogue C, Becquart P, Grard G, et al.** Concurrent chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:591-3. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1504.080664>

33. **Omarjee R, Prat CM, Flusin O, Boucau S, Tenebray B, Merle O, et al.** Importance of case definition to monitor ongoing outbreak of chikungunya virus on a background of actively circulating dengue virus, St Martin, December 2013 to January 2014. *Euro Surveill.* 2014;19:1-3.
34. **Ratsitorahina M, Harisoa J, Ratovonjato J, Biacabe S, Reynes JM, Zeller H, et al.** Outbreak of dengue and chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1135-7. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1407.071521>.
35. **Laoprasopwattana K, Suntharasaj T, Petmanee P, Suddeaugrai O, Geater A.** Chikungunya and dengue virus infections during pregnancy: Seroprevalence, seroincidence and maternal–fetal transmission, southern Thailand, 2009-2010. *Epidemiol Infect.* 2015;1-8. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268815001065>
36. **Taraphdar D, Sarkar A, Mukhopadhyay BB, Chatterjee S.** A comparative study of clinical features between monotypic and dual infection cases with chikungunya virus and dengue virus in West Bengal, India. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86:720-3. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0704>

ARTÍCULO ORIGINAL

Análisis exploratorio de ondículas de los patrones de estacionalidad del dengue en Colombia

Julián Alfredo Fernández-Niño¹, Luz Mery Cárdenas-Cárdenas², Juan Eugenio Hernández-Ávila¹,
Lina Sofía Palacio-Mejía¹, Carlos Andrés Castañeda-Orjuela²

¹ Centro de Información para Decisiones en Salud Pública (CENIDSP), Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México

² Observatorio Nacional de Salud, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El dengue tiene un comportamiento estacional asociado a los cambios climáticos, los ciclos del vector, los serotipos circulantes y las dinámicas poblacionales. El análisis de ondículas permite descomponer una serie de tiempo muy larga en sus componentes de tiempo calendario y periodo. Esta es la primera vez que se utiliza esta técnica para generar un modelo exploratorio del comportamiento del dengue en Colombia.

Objetivo. Examinar los patrones de estacionalidad interanual del dengue en Colombia, en particular en los cinco municipios más endémicos, para el periodo 2007 a 2012, y de los ciclos entre años entre 1978 y 2013 a nivel nacional.

Materiales y métodos. Se hizo un análisis exploratorio de ondículas con base en los datos de los casos incidentes de dengue reportados por semana epidemiológica en el periodo de 2007 a 2012, y por año, en el periodo de 1978 a 2013. Se utilizó un modelo autorregresivo de primer orden como hipótesis nula.

Resultados. Fue evidente el efecto de la epidemia de 2010 sobre la serie de tiempo a nivel nacional y la de los cinco municipios. Se observaron diferencias en los patrones de estacionalidad interanual por municipio. Asimismo, a nivel nacional se hallaron ciclos de dos a cinco años desde el 2004.

Conclusiones. El análisis de ondícula permite estudiar una serie de tiempo larga con patrones de estacionalidad variables, como en el caso del dengue en Colombia, e identificar diferencias por regiones. Es necesario explorar estos patrones en niveles de agregación inferiores y evaluar su relación con diversas variables predictoras.

Palabras clave: dengue/epidemiología, vigilancia epidemiológica, estudios de series temporales, estaciones del año, análisis de ondículas, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2869>

Exploratory wavelet analysis of dengue seasonal patterns in Colombia

Introduction: Dengue has a seasonal behavior associated with climatic changes, vector cycles, circulating serotypes, and population dynamics. The wavelet analysis makes it possible to separate a very long time series into calendar time and periods. This is the first time this technique is used in an exploratory manner to model the behavior of dengue in Colombia.

Objective: To explore the annual seasonal dengue patterns in Colombia and in its five most endemic municipalities for the period 2007 to 2012, and for roughly annual cycles between 1978 and 2013 at the national level.

Materials and methods: We made an exploratory wavelet analysis using data from all incident cases of dengue per epidemiological week for the period 2007 to 2012, and per year for 1978 to 2013. We used a first-order autoregressive model as the null hypothesis.

Results: The effect of the 2010 epidemic was evident in both the national time series and the series for the five municipalities. Differences in interannual seasonal patterns were observed among municipalities. In addition, we identified roughly annual cycles of 2 to 5 years since 2004 at a national level.

Conclusions: Wavelet analysis is useful to study a long time series containing changing seasonal patterns, as is the case of dengue in Colombia, and to identify differences among regions. These

Contribución de los autores:

Julián Alfredo Fernández-Niño, Juan Eugenio Hernández-Ávila y Lina Sofía Palacio-Mejía: participación en el diseño del estudio
Luz Mery Cárdenas-Cárdenas y Carlos Andrés Castañeda-Orjuela: recolección de la información

Julián Alfredo Fernández-Niño: análisis estadístico

Todos los autores contribuyeron con la interpretación de la información, y la redacción y aprobación final de manuscrito.

patterns need to be explored at smaller aggregate levels, and their relationships with different predictive variables need to be investigated.

Key words: Dengue/epidemiology, epidemiological surveillance, time series studies, seasons, wavelet analysis, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2869>

El dengue afecta a comunidades urbanas y peri-urbanas de 128 países tropicales y subtropicales, donde 3.970 millones de personas están en riesgo de contraer la infección (1). Para el 2010, se estimaba que anualmente ocurrían entre 284 y 528 millones de casos de dengue clásico en el mundo, y la región de las Américas ocupaba el tercer lugar en cuanto al número de casos de dengue clínicamente evidentes, después de Asia y África (2). En los últimos años la incidencia mundial del dengue ha mostrado una tendencia general al aumento, en particular en las Américas, Asia suroriental y el Pacífico occidental, en donde aumentó en 1,2 y 3 millones de casos en 2008 y 2013, respectivamente (3).

El dengue en Colombia todavía representa una importante proporción de la carga de enfermedad, pues genera una pérdida promedio anual estimada de 3.900 años de vida saludable ajustados por discapacidad (AVAD) (4). En el 2010, año en que ocurrió la que se considera la mayor epidemia de dengue de las últimas dos décadas en el país, se estima que se perdieron 57.017 AVAD a causa del dengue (4). Dada su alta incidencia, la enfermedad tiene un gran impacto en los sistemas de salud en términos de costos, los cuales aumentan con la gravedad clínica. En dos estudios se ha evaluado el impacto económico del dengue en Colombia. En uno de ellos se estimó que el promedio del costo directo de atención para el 2011 era de USD\$ 76,1 en los casos ambulatorios, de USD\$ 705,1 en los de pacientes hospitalizados con dengue, y de USD\$ 1.115,9 en aquellos de pacientes con dengue grave (5). En el segundo estudio, se estimó que en 2012 el promedio de los costos directos e indirectos por caso ascendía a USD\$ 202,3 para la atención ambulatoria del dengue, mientras que, para un caso de paciente hospitalizado o un caso de dengue grave, los costos alcanzaron USD\$ 497,9 y USD\$ 2.306,7, respectivamente (6).

En 2014, en Colombia se notificaron al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Sivigila) 110.473 casos de dengue (tasa de incidencia de 413,5 por 100.000 habitantes), de los cuales 2,5 % correspondía a dengue grave y 53 % a casos en menores de 14 años (7). La incidencia del dengue en Colombia parece tener un comportamiento cíclico que tiende a repetirse cada tres o cuatro años (8). Entre el 2001 y el 2003 se produjeron diversos brotes de fiebre por dengue o dengue clásico, y el mayor pico se alcanzó en el 2002, con una incidencia anual de 372 casos por 100.000 habitantes (8). Como ya se mencionó, la mayor epidemia ocurrió en el 2010 cuando la incidencia anual llegó a ser de 577 casos por 100.000 personas (9). También, se registró un aumento de la proporción de casos de dengue grave entre el 2000 y el 2009, aunque esta disminuyó durante el 2010 y el 2011 (9). En este contexto, la mortalidad por dengue ha tenido un incremento, pues en la década de 1990 el número de muertes fue de 439, en tanto que en la década de 2000 a 2011 ocurrieron 1.040 muertes por dengue (9).

El dengue tiene un comportamiento estacional variable asociado a los cambios climáticos, los ciclos del vector, los serotipos circulantes y las dinámicas poblacionales (10,11), factores que interactúan de un modo complejo que aún no se ha comprendido del todo y que explican los cambios en los patrones de transmisión. Por esta razón, la transmisión del dengue en áreas endémicas se caracteriza por una falta de linealidad en la tendencia, una estacionalidad variable con ciclos entre años que varían en el tiempo y la aparición de epidemias periódicas combinadas con brotes a intervalos irregulares (10,11). Por ello, su análisis mediante modelos de series de tiempo convencionales o modelos lineales generalizados resulta poco adecuado, dado que estos, en general, no consideran los cambios en el comportamiento periódico de las series de tiempo (12), sino que asumen que sus propiedades matemáticas se conservan a lo largo de la serie. Así pues, el análisis estadístico de tales series de tiempo plantea retos metodológicos importantes que requieren de técnicas estadísticas más sofisticadas.

Correspondencia:

Luz Mery Cárdenas-Cárdenas, Observatorio Nacional de Salud, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: 220 7700, extensión 1263

merlu_85@hotmail.com, lcardenasc@ins.gov.co

Recibido: 06/06/15; aceptado: 03/12/15

El análisis de ondículas permite tener en cuenta simultáneamente los cambios temporales y el comportamiento periódico de las series de tiempo, medir las asociaciones (coherencia) entre dos series de tiempo en cualquier banda de frecuencia (periodo) y en cada ventana de periodo (10-12) y, por último, puede usarse para separar los efectos estacionales de los efectos de la variabilidad interanual (10). Esta técnica se ha utilizado previamente en diversos estudios en otros países con contextos epidemiológicos similares a los de Colombia para entender la dinámica de la transmisión del dengue según la variabilidad estacional e interanual, principalmente en relación con los cambios climáticos (10-13); no obstante, hasta donde sabemos, los datos de dengue en Colombia no se han analizado mediante esta técnica. En este primer análisis se examinaron los patrones de estacionalidad interanual del dengue en el país y en sus cinco municipios más endémicos en el periodo de 2007 a 2012, así como de los ciclos entre años de 1978 a 2013 a nivel nacional.

Materiales y métodos

Diseño del estudio

Se hizo un estudio ecológico exploratorio de varios periodos y lugares a nivel nacional y, en particular, de los cinco municipios más endémicos para dengue en el país (Cali, Bucaramanga, Medellín, Cúcuta e Ibagué). Este primer estudio pretende ser el punto de partida de diseños analíticos, pero, por lo pronto, solo se exploraron las diferencias en los patrones de estacionalidad entre los municipios más endémicos para ilustrar la utilidad de la técnica de ondículas, así como los patrones de los ciclos entre años a nivel nacional en un periodo más amplio.

Fuente de los datos

Los casos de dengue a nivel nacional y en los cinco municipios más endémicos del país por semana epidemiológica entre 2007 y 2012 se obtuvieron del Sivigila (7), el cual es el referente de información en el país para los eventos de interés en salud pública. Para el análisis entre años, los datos sobre los casos de dengue se obtuvieron del Ministerio de Salud y Protección Social para los años 1978 a 2003 (14) y del Sivigila para el periodo 2004 a 2013.

Análisis estadístico

El análisis de ondículas es una descomposición local espectral de una serie de tiempo en sus dos componentes: tiempo (t) y frecuencia-periodo (τ)

(12,15). Estadísticamente, la transformada de ondícula (*wavelet*) descompone una señal usando funciones (ondículas), que se estrechan cuando las características de alta frecuencia están presentes, y se ensanchan en las estructuras de baja frecuencia (12,15). Esta descomposición produce una buena localización en tiempo y frecuencia (o periodo) de la intensidad de la señal, la cual es adecuada para la investigación de la evolución temporal de las señales aperiódicas y transitorias. El análisis de ondículas es una descomposición de tiempo y frecuencia con una compensación óptima entre el tiempo y la resolución de la frecuencia, que permite revelar cómo los componentes estacionales de una serie cambian con el tiempo. En una serie epidemiológica de tiempo, la intensidad equivale al número de casos de una enfermedad en un momento del tiempo, el tiempo calendario depende de la frecuencia con que se reportan o analizan los casos, y el efecto de periodo se refiere al patrón de ciclos dentro de la intensidad (12).

Esta técnica es particularmente útil cuando la serie de tiempo no conserva sus propiedades matemáticas a lo largo del tiempo. Desde el punto de vista epidemiológico, esto sucede cuando se dan cambios en la estacionalidad de un fenómeno o este tiene patrones complejos y ruidosos, como puede pasar con series de tiempo muy largas, o en el caso de las enfermedades infecciosas cuando cambian los patrones de transmisión debido a los cambios en el tiempo de los factores determinantes de su aparición (16). Esta técnica se ha utilizado ampliamente en epidemiología para el análisis del comportamiento de las enfermedades infecciosas, especialmente para analizar su relación con las variables climáticas (12,17-25).

En resumen, de una señal $x(t)$ (una serie de tiempo), se desprende una función de ondícula definida como sigue:

$$\Psi_X(\alpha, \tau) = \frac{1}{\sqrt{\alpha}} \int_{-\infty}^{\infty} X(t) \Psi^*\left(\frac{t-\tau}{\alpha}\right) dt = \int_{-\infty}^{\infty} X(t) \Psi^*(t) dt,$$

donde $x(t)$ representa la serie de tiempo de cada valor de x (la intensidad) en cada tiempo t , siendo α la ventana dentro de la cual se examina el cambio en cada coordenada bidimensional de tiempo calendario (t) y periodo (τ), y donde Ψ es la función de ondícula. La transformada de ondícula aparece básicamente como un filtro lineal cuya función de respuesta está dada por la función de ondícula; la función de Morlet es la más utilizada en epidemiología (18) y fue la empleada en el presente estudio.

La interpretación del análisis de ondículas deriva de la lectura de gráficas en dos dimensiones, en las cuales el eje de las Y corresponde al período (τ) y, el eje de las X, al tiempo (t). Por período (τ) nos referimos al ciclo, es decir, a la frecuencia de los picos, y por tiempo (t) nos referimos al tiempo calendario, de modo que para cada coordenada (t, τ), se estima el valor de la función de ondícula. Según el grado de intensidad de dicha función en cada punto (t, τ), el análisis gráfico presenta un color más cálido, es decir, a mayor intensidad mayor calidez del color de manera que se pueden observar simultáneamente las áreas de periodo-tiempo donde se presenta la mayor intensidad de la infección. Además, aquellas áreas estadísticamente significativas bajo la hipótesis nula aparecen bordeadas por una línea oscura.

Los efectos se deben analizar dentro de un cono de influencia para eliminar los efectos limítrofes, ya que el análisis supone una circunvolución en la serie de tiempo en la cual se conecta el último punto con el primero. Debe mencionarse que, para este trabajo, se recurrió al análisis estándar desarrollado en otras aplicaciones similares recientes (10-12). Los detalles matemáticos de este modelo exceden el alcance de este estudio, en el cual se hace una aplicación empírica específica, pero pueden consultarse en la literatura científica pertinente (15-16,19).

Para el presente análisis, se obtuvo la raíz cuadrada del número de casos de dengue por semana epidemiológica para manejar la variabilidad de la serie a lo largo del tiempo y para normalizar su amplitud, tal como se ha hecho en varios estudios previos que utilizan esta técnica, en algunos de los cuales se analizaron las series de tiempo para el dengue (16-21). En todas las aplicaciones conocidas en epidemiología, se usan como medida de intensidad los casos en lugar de las proporciones o tasas de incidencia.

Para determinar la significación estadística, se consideró que, por lo general, en las enfermedades infecciosas hay una autocorrelación de los casos debido al hecho evidente de que la transmisión depende frecuentemente de una misma fuente de infección, o al menos varios de los casos compartan una fuente, o puede haber puntos clave por el inicio de brotes epidémicos con factores determinantes comunes. En consecuencia, estadísticamente es esperable que en cualquier punto de tiempo dado, la incidencia se asocie con la del punto de tiempo anterior. Por esta razón, estas series de tiempo son

más propensas a variar en períodos más largos y a mostrar supuestos patrones de estacionalidad debido a la autocorrelación.

Dado que el análisis exploratorio de la serie de casos de dengue en Colombia puso en evidencia una autocorrelación de primer orden, con el fin de incorporar la posible influencia de la autocorrelación de corto plazo en las características de largo plazo, la hipótesis nula no fue el ruido blanco, sino que se definió que la variabilidad de la serie temporal observada era equivalente a la variabilidad esperada de un proceso aleatorio con autocorrelación de primer orden (16), tal como se propuso en la metodología de un estudio similar (10). Las áreas significativas con un alfa de 0,05 se señalaron como áreas sombreadas.

Todos los análisis se hicieron con el paquete *biwavelet 3.2.0* de la *R Foundation for Statistical Computing*.

Resultados

La figura 1 presenta la serie de tiempo en semanas epidemiológicas entre el 2007 y el 2012 para todo el país, y la descomposición del espectro de poder de su ondícula. Este espectro de poder se vio notoriamente afectado por la gran epidemia del 2010, de manera que ocultó otros potenciales efectos estacionarios con una significación relativamente menor. Cuando la intensidad en un período ($t^{**} - t^*$) determinado (como el año 2010) es tan alta, la función $\Psi(t, \tau)$ para todo el vector de la ondícula dentro de ($t^{**} - t^*$) afecta un amplio rango de periodos y dificulta la determinación de la estacionalidad. La figura 2 muestra el mismo análisis con exclusión del año 2010, es decir, como si la epidemia no se hubiera presentado, lo cual es válido dado que el análisis en el primer ejercicio pretendía determinar, ante todo, la estacionalidad interanual. Se observó, entonces, que en el 2007, y menos claramente en el 2008, hubo ciclos estadísticamente significativos cada cuatro a ocho semanas. En el 2009 se halló un amplio rango del efecto de período, aunque esto podría explicarse porque la epidemia comenzó realmente en dicho año, como se observa en la serie de tiempo.

En la figura 3 se presentan las series de tiempo y sus respectivos espectros de poder para los cinco municipios más endémicos del país. En todos, exceptuando Cúcuta, hubo un efecto muy acentuado de la epidemia de 2010. En Cúcuta se observó un patrón estacional que, aunque no fue continuo, sí fue relativamente constante a lo largo

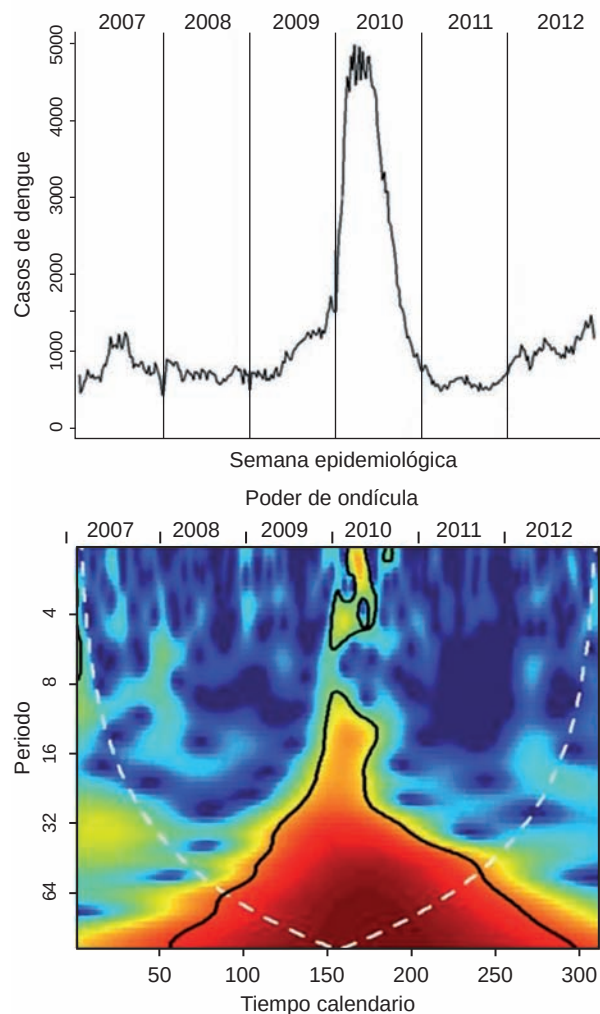


Figura 1. Serie de tiempo de los casos de dengue a nivel nacional y su respectivo análisis de ondículas, 2007-2012. El tiempo calendario y el periodo se expresan en semanas epidemiológicas. En el caso del tiempo calendario, son semanas consecutivas, y 1 corresponde a la primera semana epidemiológica de 2007. Los colores más cálidos denotan una gran intensidad; las áreas bordeadas de negro indican efectos estadísticamente significativos con un alfa de 0,05; la raya blanca punteada es el cono de influencia, y los efectos dentro del cono son aquellos que no se ven afectados por el efecto límite de la circunvolución de la serie.

del tiempo, con ciclos cortos estadísticamente significativos de cuatro a ocho semanas en algunos años, pero muy localizados en el tiempo, por lo que no hubo claridad de que constituyera un verdadero efecto estacional. El hecho de que no hubiera sido continuo refleja que, de existir este patrón de ciclos, estuvo muy localizado en el tiempo y no fue constante dentro de cada año. En el resto de municipios no se identificaron efectos de periodo corto o largo, a excepción del año 2010, que permitieran sugerir una estacionalidad interanual.

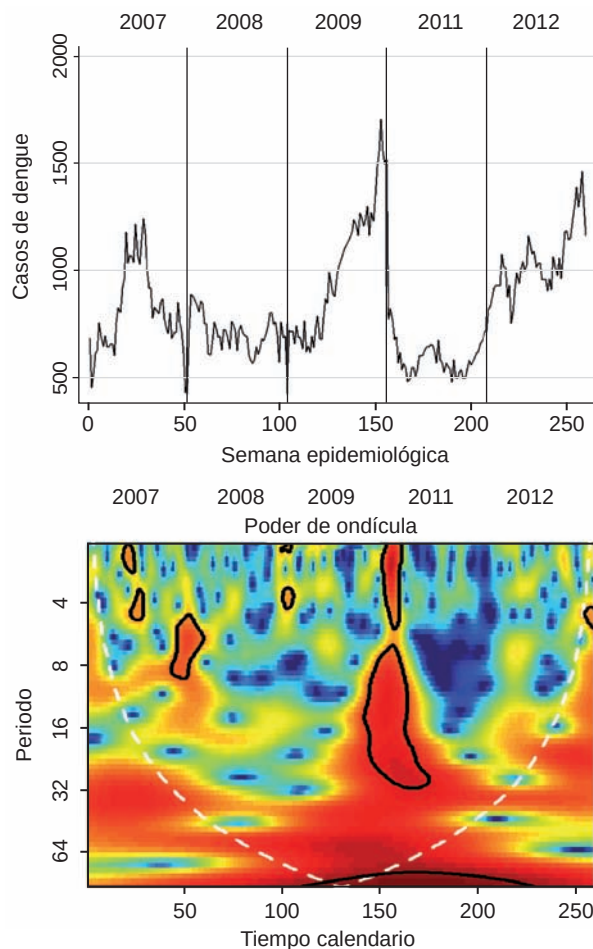


Figura 2. Serie de tiempo de los casos de dengue a nivel nacional y su respectivo análisis de ondículas (excluida la epidemia de 2010), 2007-2012.

El tiempo calendario y el periodo se expresan en semanas epidemiológicas. En el caso del tiempo calendario, son semanas consecutivas, y 1 corresponde a la primera semana epidemiológica de 2007. Los colores más cálidos denotan una gran intensidad; las áreas bordeadas de negro indican efectos estadísticamente significativos con un alfa de 0,05; la raya blanca punteada es el cono de influencia, y los efectos dentro del cono son aquellos que no se ven afectados por el efecto límite de la circunvolución de la serie.

En la figura 4 se presentan las series y sus espectros de poder para los cinco municipios más endémicos del país, de nuevo con exclusión del 2010. Se observaron patrones variables en cada municipio. Por ejemplo, en todos los municipios analizados, excepto en Cali, se hallaron ciclos no continuos pero permanentes de cuatro a ocho semanas, que fueron estadísticamente significativos y se localizaron en el 2007 y el 2008, los cuales no fueron visibles (salvo en Medellín) en el 2011 ni en el 2012. En el caso de Medellín, llamó la atención que estos ciclos se mantuvieran, aunque

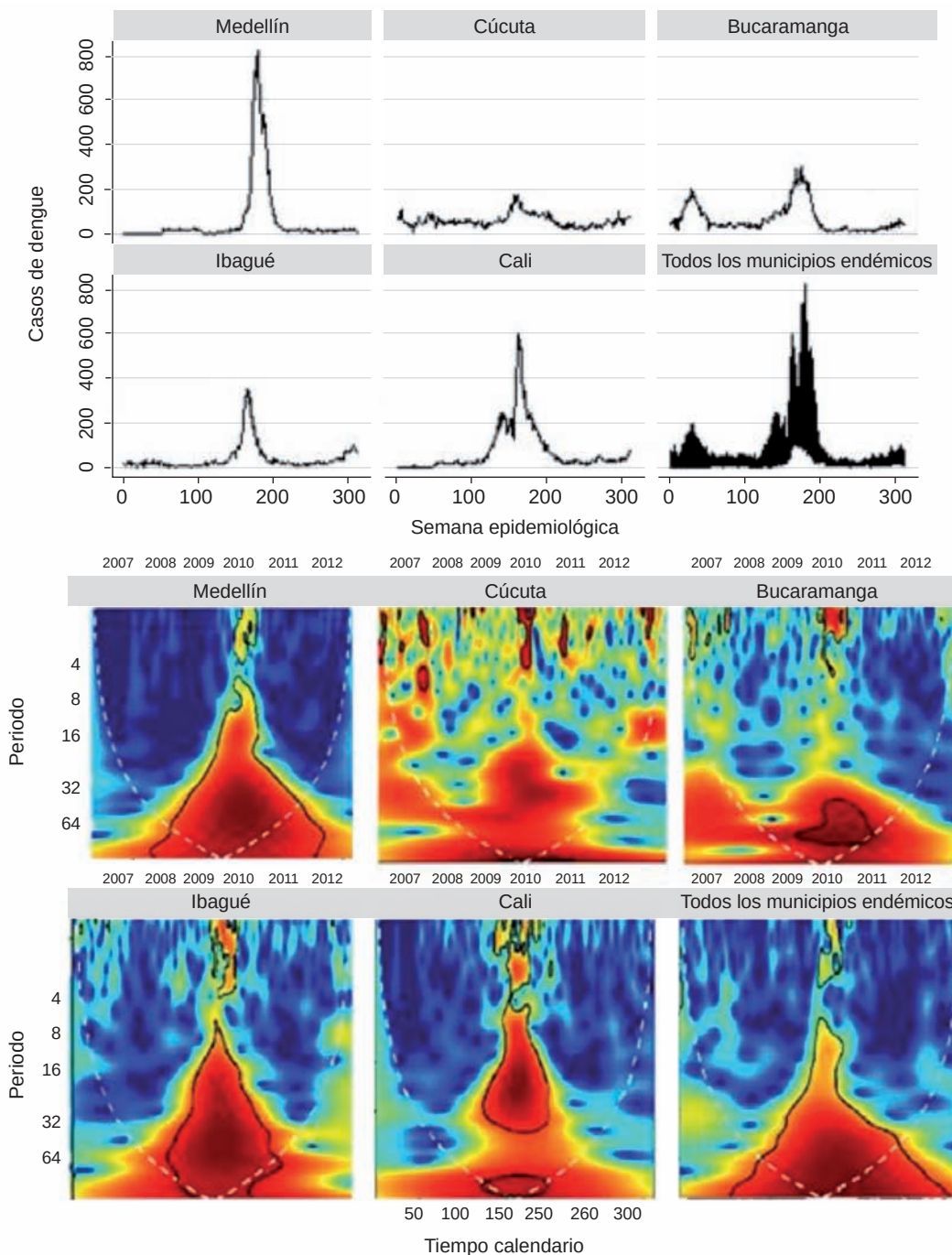


Figura 3. Series de tiempo de los casos de dengue y sus respectivos análisis de ondículas en los cinco municipios más endémicos del país, 2007-2012

El tiempo calendario y el periodo se expresan en semanas epidemiológicas. En el caso del tiempo calendario, son semanas consecutivas, y 1 corresponde a la primera semana epidemiológica de 2007. Los colores más cálidos denotan una gran intensidad; las áreas bordeadas de negro indican efectos estadísticamente significativos con un alfa de 0,05; la raya blanca punteada es el cono de influencia, y los efectos dentro del cono son aquellos que no se ven afectados por el efecto límite de la circunvolución de la serie.

de forma muy discontinua, a lo largo de todos los años del estudio, aunque debe considerarse que estos últimos también reflejaron el comienzo de la epidemia en el 2009 y que hubo un efecto de salto

en el tiempo. A pesar de estos hallazgos, no hubo un patrón claro y continuo que permitiera sugerir un patrón estacional interanual claro y constante en todos los años.

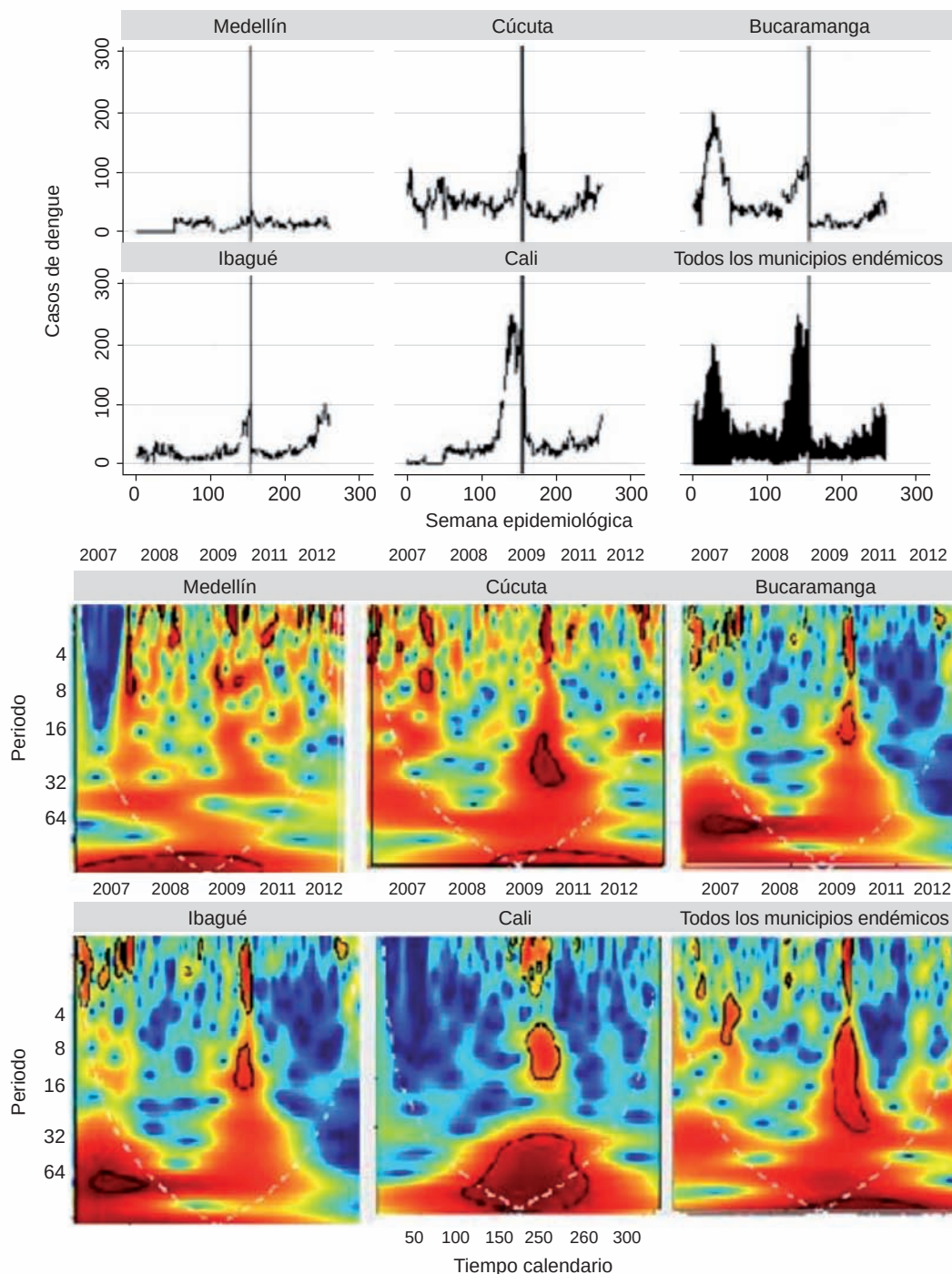


Figura 4. Series de tiempo de los casos de dengue y sus respectivos análisis de ondículas en los cinco municipios más endémicos del país (excluida la epidemia de 2010), 2007-2012

El tiempo calendario y el periodo se expresan en semanas epidemiológicas. En el caso del tiempo calendario, son semanas consecutivas, y 1 corresponde a la primera semana epidemiológica de 2007. Los colores más cálidos denotan una gran intensidad; las áreas bordeadas de negro indican efectos estadísticamente significativos con un alfa de 0,05; la raya blanca punteada es el cono de influencia, y los efectos dentro del cono son aquellos que no se ven afectados por el efecto límite de la circunvolución de la serie.

Por último, para ampliar la perspectiva se presenta la serie temporal anual y su correspondiente espectro de poder de ondícula a nivel nacional

desde 1978 hasta 2013 (figura 5). Se observaron ciclos de dos a cinco años, los cuales han sido intensos desde 1995. Hay que tener en cuenta

que, al ser anuales, estos datos son limitados debido a los pocos puntos de observación y la consecuente baja resolución. Ello explicaría que los efectos solo fueran significativos a partir del 2004, aunque desde años atrás se evidenciaba cierto halo de intensidad asociado a estos ciclos. Asimismo, aunque este efecto de ciclo se mantuvo más allá de este año, se vio afectado por los efectos limítrofes, en especial, porque la epidemia de 2010 se produjo cerca del fin de la observación, que fue el 2013.

Discusión

Este artículo presenta la primera implementación exploratoria del análisis de ondículas en el estudio de la incidencia del dengue en Colombia. Esta técnica ya había sido utilizada previamente en diversos contextos epidemiológicos, incluidos

algunos relativamente similares al colombiano, para determinar diferencias en los patrones estacionales de la enfermedad (10,13,20,22). En Perú, por ejemplo, el análisis de ondículas permitió recientemente encontrar diferencias en los ciclos de transmisión en las tres grandes regiones de ese país: costa, sierra y selva (20). En estudios similares realizados en otros países, esta técnica (18,21-25) se ha empleado no solo para el estudio de la estacionalidad del dengue, sino también, para el del comportamiento histórico de otras enfermedades infecciosas como el cólera (12), el sarampión (12,17) y la influenza (21).

El análisis presentado aquí es exploratorio y permite solamente ilustrar la utilidad de la técnica para detectar diferencias regionales en la transmisión, en especial, cuando estas cambian en el tiempo. Se trata de un método no paramétrico que utiliza toda la información de la serie derivada del vector $X(t)$, lo cual es especialmente útil cuando las propiedades estadísticas de la serie varían en el tiempo y se quiere comprender globalmente la transmisión. Ciertamente, la técnica tiene una orientación acentuadamente gráfica, que no permite resumir el fenómeno en un número parsimonioso de parámetros, como en los modelos estadísticos convencionales, porque el espectro de poder de ondícula al final se presenta como una área bidimensional y las pruebas estadísticas se aplican sobre estas mismas áreas, de modo que no hay inferencia sobre uno o varios parámetros, como en las series de tiempo, sino que se usan “series de tiempo sustitutas” como hipótesis nulas (16).

Una limitación del análisis gráfico es que, cuando estas áreas (t, τ) son estadísticamente significativas, aparecen como coordenadas variables e irregulares que por lo mismo son difíciles de delimitar con precisión. Sin embargo, la comprensión de este comportamiento nacional y particular requeriría de datos sobre el cambio en los factores determinantes de la transmisión, lo cual excede el alcance de este estudio.

En esta aplicación en concreto, se encontró que en una epidemia como la del 2010 (que equivale a 52 periodos, es decir, a una quinta parte de la serie y con un patrón unimodal de único pico), la técnica no permite determinar cabalmente los patrones de estacionalidad interanual, en especial porque se trató de una epidemia de gran intensidad, ya que por fuera del periodo epidémico se podrían ocultar los efectos estacionarios de periodos más cortos,

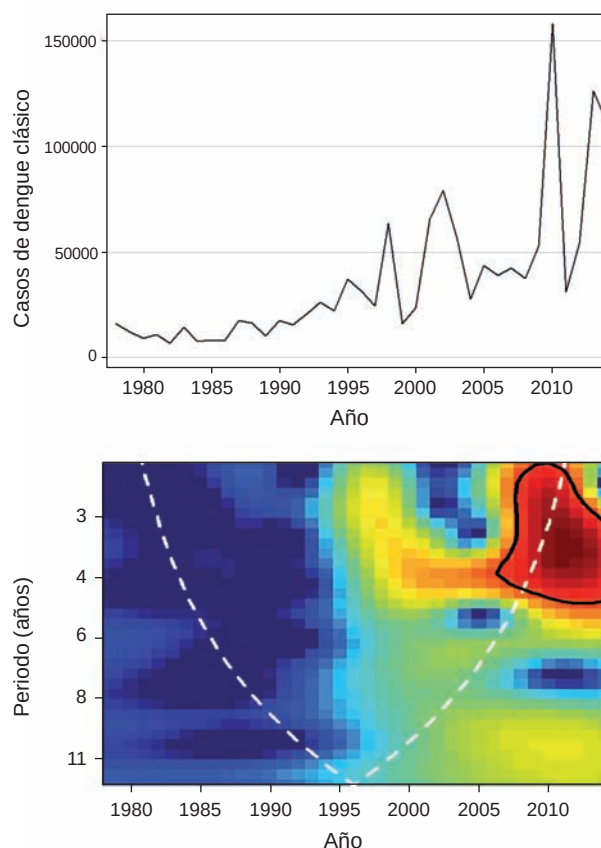


Figura 5. Serie de tiempo de los casos anuales de dengue a nivel nacional y su respectivo análisis de ondículas, 1978-2013. El tiempo calendario y el periodo se expresan en años. Los colores más cálidos denotan una gran intensidad; las áreas bordeadas de negro indican efectos estadísticamente significativos con un alfa de 0,05. La raya blanca punteada es el cono de influencia, y los efectos dentro del cono son aquellos que no se ven afectados por el efecto límite de la circunvolución de la serie.

debido a las acentuadas diferencias relativas en el espectro de poder (16). El análisis de ondículas sería mucho más útil para descomponer una serie de tiempo en la que los brotes no se extendieran por tantos periodos. En el caso de requerirse el estudio de series de tiempo con uno o varios brotes de larga duración (larga en relación con el periodo), se necesitarían series de tiempo más largas para así poder identificar los patrones de los ciclos. Fue por esta razón que se amplió el horizonte al examinar la ciclos entre años de 1978 a 2013 (figura 5).

Se han encontrado ciclos estacionales del dengue entre años en diversos estudios relativamente coincidentes con los hallazgos de este trabajo. Los patrones de ciclos entre años hallados ya habían sido sugeridos en un estudio previo en Colombia, en el cual se analizó la incidencia del dengue entre 2004 y 2013, y se evidenciaron ciclos de tres a cuatro años (8). Los hallazgos en otras partes del mundo sugieren la presencia de ciclos de dos años en Ecuador (13), de dos a tres años en Tailandia y Vietnam (18,24), y de tres a seis años en Puerto Rico (10); no obstante, la periodicidad del dengue continúa siendo objeto de estudio y discusión. Entre los potenciales factores determinantes de estos ciclos se encuentran los cambios climáticos, la circulación viral, la inmunidad de las poblaciones y las condiciones propias de cada región (13), lo cual hace que la comprensión y la predicción de los patrones de los ciclos del dengue sean complejas.

Este análisis también permitió sugerir posibles diferencias en los patrones estacionarios interanuales entre municipios, incluso en este caso en que los cinco estudiados son muy endémicos, lo cual constituye otro beneficio potencial de la técnica como sustento en la adopción de decisiones (10). La capacidad del análisis de ondículas para comparar la transmisión entre regiones ya había sido puesta a prueba en otros contextos epidemiológicos (10,20). Con relación a las diferencias en los patrones de los ciclos interanuales del dengue, un estudio en Brasil determinó ciclos de la infestación del vector con una periodicidad de una a cuatro semanas, especialmente al final de la primavera e inicio del verano (23); pero, hasta donde sabemos, no existen estudios que hayan reportado la periodicidad interanual de la incidencia del dengue con datos por semanas, lo cual podría generar un mayor interés por la periodicidad entre años. Aunque este análisis de ondículas permitió sugerir cierta heterogeneidad regional en la transmisión, no se

identificó un patrón claro y continuo que mostrara una pauta estacional interanual de forma clara y constante en todos los seis años de estudio.

Este esfuerzo de análisis a nivel de municipio se hizo porque una limitación general de los trabajos que han empleado esta técnica para analizar la transmisión del dengue, es que se hicieron en niveles de agregación muy altos, y tanto las comparaciones como el análisis de una región reflejan un comportamiento forzosamente agregado que no reconoce la heterogeneidad interna de los ciclos de transmisión y sus factores determinantes, por lo que probablemente el método sea útil solo en niveles de agregación más bajos, con unos patrones de transmisión y de factores determinantes relativamente homogéneos en lo geográfico y en cada momento del tiempo. En caso de unidades muy altas, los ciclos no podrían determinarse si no son homogéneos y, además, sincrónicos en el tiempo, o si los factores determinantes de la transmisión son diferentes.

En este análisis se encontraron diferencias en los ciclos estacionales por municipio, especialmente en Cúcuta y Medellín, en todos los años de estudio. Lo anterior resulta relevante si se considera que estos dos municipios pertenecen a las regiones del centro-oriente y centro-occidente del país, que, si bien no tienen el mayor número de población expuesta al dengue, sí contribuyen con la mayor carga de enfermedad del país, aproximadamente, 60 % de los casos (14). Con base en la bibliografía consultada, las diferencias encontradas en los ciclos estacionales de Medellín y Cúcuta, además de responder a los factores climáticos y a las condiciones sociales, podrían explicarse por el hecho de ser ciudades densamente pobladas con importante actividad comercial, gran movilidad de la población, circulación simultánea de los cuatro serotipos del virus del dengue (14), y, probablemente, con problemas de control del vector debidos a la resistencia de *Aedes aegypti* a los insecticidas, tal como se ha reportado en estudios en Cúcuta y en otros municipios del país (26,27).

La condición de Cúcuta como municipio de frontera terrestre entre Colombia y Venezuela constituye una importante situación de interés para la vigilancia epidemiológica. Según lo reportado por el Observatorio Nacional de Salud para el año 2012, el dengue fue el evento de interés en salud pública de mayor incidencia en los municipios de frontera, siendo Cúcuta uno de los municipios

fronterizos con mayor número de reportes (28). La circulación del virus del dengue entre diferentes países, y su posible repercusión en la periodicidad de la infección, requieren de acciones para el fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica en dichas áreas.

Se necesitan estudios analíticos que utilicen análisis de coherencia a nivel del país, las regiones y los municipios para entender los factores determinantes de las diferencias geográficas y temporales. Entre dichos factores sobresalen los cambios climáticos, los ciclos del vector, los serotipos circulantes y las dinámicas poblacionales (10,13,20). De todos ellos, el clima ha sido uno de los factores más estudiados, específicamente los cambios de la temperatura, la precipitación y la humedad, los cuales influyen en los procesos de alimentación, supervivencia y proliferación del vector, así como en la replicación del virus (11,29,30). Los resultados de los estudios hechos en Ecuador sugieren que existe coherencia entre la incidencia del dengue y la temperatura en ciclos bianuales y anuales (13), mientras que en Vietnam se han encontrado asociaciones del dengue con la humedad, la temperatura y la precipitación en modo anual (24). Asimismo, se ha encontrado coherencia entre la abundancia de *A. aegypti* y las estaciones climáticas, especialmente al final de la primavera e inicio del verano en Brasil (23). Sin embargo, la relación entre el clima, el ciclo del vector y la transmisión es compleja y está muy lejos de ser entendida. Debe considerarse, además, que hay muchos más factores que afectan la transmisión y que su interacción dinámica produce diversos patrones de transmisión que no siempre corresponden a lo esperado.

Del mismo modo, la evidencia en torno al efecto de la variabilidad climática interanual y entre periodos de más años, y su relación con los cambios climáticos en la transmisión y la propagación del dengue, tampoco es del todo concluyente (10). Así, por ejemplo, con relación a la asociación entre la incidencia del dengue y el fenómeno de El Niño, la evidencia parece sugerir que las epidemias periódicas podrían asociarse con este fenómeno (10,11); no obstante, la información existente no permite aún llegar a conclusiones definitivas. En países como Puerto Rico y Tailandia se encontró que la incidencia del dengue se asociaba con el fenómeno de El Niño, pero en México no se encontró dicha asociación (10). Debe comprenderse que la relación entre clima global, clima local, ciclo del vector y transmisión de la enfermedad no

ha podido demostrarse en la práctica. Sin duda, estas relaciones existen, pero son complejas y no lineales, y probablemente existan muchos elementos modificadores del efecto, lo cual lleva a concluir que la transmisión sería el resultado de la interacción dinámica entre todos estos factores y otros que aún no se conocen, incluida la vulnerabilidad inmunitaria de la población frente a la transmisión.

Parte de las divergencias en torno al efecto de los fenómenos climáticos en la transmisión podría deberse a que, en estos estudios, el análisis se ha hecho a nivel de país y enfocado en los ciclos de transmisión, de manera que las condiciones locales (climáticas, entomológicas y epidemiológicas) que se verían afectadas por el clima son diferentes. Estos análisis reflejan, entonces, un efecto promedio y no particularizado localmente. En este sentido, estas relaciones deben analizarse en Colombia, aunque con un enfoque de regiones más localizado, dada la gran heterogeneidad climática del país, lo cual explicaría que en los diversos estudios no se haya encontrado un efecto claro de los fenómenos climáticos regionales.

Otro factor de importancia en salud pública que no se ha documentado en el país es el efecto de las medidas de control. Con respecto a otras enfermedades, el análisis de ondículas ha revelado que el control puede producir cambios drásticos en la intensidad y en el patrón de los ciclos, como se ha observado en el sarampión o el cólera (12), con periodos cada vez más largos entre ciclos. Así, el presente análisis podría servir para evaluar los efectos de las medidas de control sobre los ciclos del dengue e, incluso, para comparar diversas intervenciones de largo plazo.

Este primer estudio es un buen punto de partida para el desarrollo de nuevas investigaciones científicas que permitan analizar a profundidad las diferencias en los patrones estacionales del dengue, sus determinantes y su variación en el tiempo. Esta aplicación exploratoria permitió demostrar que, dado el comportamiento variable del dengue en Colombia, el análisis de ondículas puede ser de utilidad para entender mejor su transmisión y sus factores determinantes, incorporando datos de variables climáticas, entomológicas, poblacionales y de control en nuevos estudios. Por otro lado, esta técnica podría implementarse de modo rutinario en los sistemas de vigilancia para respaldar la evaluación y la adopción de decisiones de control, y para la vigilancia de los cambios a mediano y

largo plazo de la transmisión a nivel nacional y en cada municipio endémico. La disponibilidad de aplicaciones gratuitas como la empleada en este estudio hace posible su uso, y sus potenciales aportes al proceso de adopción de decisiones en salud pública son prometedores.

Dada su naturaleza ecológica, la principal limitación de este estudio se refiere a la utilización de datos secundarios. El análisis de ondículas depende de la calidad de la información, del registro adecuado del total de casos de dengue y del correcto registro de la fecha y lugar de su aparición. Si bien el Sivigila es el referente de información sobre el dengue y sobre otros 81 eventos de interés en salud pública en Colombia, en términos de la cobertura de la notificación y la calidad de la información, los reportes consultados presentan algunas deficiencias (31-33). En estudios previos sobre la situación del sistema de vigilancia de los casos de dengue en Colombia, se concluyó que la cobertura de la notificación no es del 100 %, y se señalan deficiencias en la notificación, así como desconocimiento de los lineamientos nacionales de vigilancia en salud y resistencia de algunos prestadores de servicios a integrarse al sistema por considerar las actividades como una carga adicional (32), aspecto que también se plantea en un estudio sobre la cobertura del Sivigila, en el cual se encontró que en el 2012 era de 58,5 % (33).

Además, en estudios realizados en diferentes ciudades endémicas del país se han reportado niveles bajos de concordancia y sensibilidad entre la notificación de dengue al Sivigila y las definiciones clínicas sugeridas por la Organización Mundial de la Salud (30). Esta limitación no invalida, sin embargo, la utilidad de los resultados de este estudio, más cuando la estacionalidad se analizó a nivel nacional y en los municipios más endémicos, y, por el contrario, reitera la necesidad del fortalecimiento del Sivigila, lo que combinado con estrategias de análisis como la que aquí se presenta, representaría un respaldo importante a las decisiones en salud pública, pues la conjugación de los sistemas de vigilancia y las técnicas de análisis automatizadas tiene posibilidades enormes que deben tenerse en cuenta.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiación

Ninguna.

Referencias

1. **Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al.** Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1760. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760>
2. **Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al.** The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496:504-7. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12060>
3. **World Health Organization.** Dengue and severe dengue. Fecha de consulta: 5 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
4. **Castro RR.** Costos del dengue en Colombia (2010-2012). Impacto en salud pública. Fecha de consulta: 29 de abril de 2015. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=25900&Itemid=
5. **Castañeda-Orjuela C, Díaz H, Álviz-Guzmán N, Olarte A, Rodríguez H, Camargo G, et al.** Burden of disease and economic impact of dengue and severe dengue in Colombia, 2011. *Value Health Reg Issues.* 2012;1:123-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vhri.2012.09.014>
6. **Castro-Rodríguez R, Galera-Gélvez K, López-Yescas JG, Rueda-Gallardo JA.** Costs of dengue to the health system and individuals in Colombia from 2010 to 2012. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92:709-14. <http://dx.doi.org/doi:10.4269/ajtmh.14-0386>
7. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del evento dengue, hasta el periodo epidemiológico XIII, Colombia, 2014. Fecha de consulta: 2 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Paginas/informes-de-evento.aspx>
8. **Castrillón JC, Castaño JC, Urcuquí S.** Dengue in Colombia: Ten years of database records. *Rev Chilena Infectol.* 2015;32:22-9. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182015000200004>
9. **Villar LA, Rojas DP, Besada-Lombana S, Sarti E.** Epidemiological trends of dengue disease in Colombia (2000-2011): A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e0003499. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003499>
10. **Johansson MA, Cummings DA, Glass GE.** Multiyear climate variability and dengue-El Niño southern oscillation, weather, and dengue incidence in Puerto Rico, Mexico, and Thailand: A longitudinal data analysis. *PLoS Med.* 2009;6:e1000168. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1000168>
11. **Thai KT, Anders KL.** The role of climate variability and change in the transmission dynamics and geographic distribution of dengue. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011;236: 944-54. <http://dx.doi.org/10.1258/ebm.2011.010402>
12. **Cazelles B, Chávez M, Magny GC, Guégan JF, Hales S.** Time-dependent spectral analysis of epidemiological time-series with wavelets. *J R Soc Interface.* 2007;4:625-36. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2007.0212>
13. **Stewart-Ibarra AM, Muñoz AG, Ryan SJ, Ayala EB, Borbor-Córdova MJ, Finkelstein JL, et al.** Spatiotemporal clustering, climate periodicity, and social-ecological risk

- factors for dengue during an outbreak in Machala, Ecuador, in 2010. *BMC Infect Dis.* 2014;14:610. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-014-0610-4>
14. **Padilla JC, Rojas DP, Sáenz-Gómez R.** Dengue en Colombia. Epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Bogotá: Gufas de Impresión Ltda; 2012.
 15. **Cazelles B, Hales S.** Infectious diseases, climate influences, and nonstationarity. *PLoS Med.* 2006;3:e328. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0030328>
 16. **Cazelles B, Cazelles K, Chávez M.** Wavelet analysis in ecology and epidemiology: Impact of statistical tests. *J R Soc Interface.* 2013;11:20130585. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2013.0585>
 17. **Grenfell BT, Bjørnstad ON, Kappey J.** Travelling waves and spatial hierarchies in measles epidemics. *Nature.* 2001;414:716-23. <http://dx.doi.org/10.1038/414716a>
 18. **Cazelles B, Chávez M, McMichael AJ, Hales S.** Nonstationary influence of El Niño on the synchronous dengue epidemics in Thailand. *PLoS Med.* 2005;2:e106. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0020106>
 19. **Adak S.** Time-dependent spectral analysis of nonstationary time series. *J Am Stat Assoc.* 1998;93:1488-501. <http://dx.doi.org/10.2307/2670062>
 20. **Chowell G, Cazelles B, Broutin H, Munayco CV.** The influence of geographic and climate factors on the timing of dengue epidemics in Perú, 1994-2008. *BMC Infect Dis.* 2011;11:164. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-11-164>
 21. **Viboud C, Bjørnstad ON, Smith DL, Simonsen L, Miller MA, Grenfell BT.** Synchrony, waves, and spatial hierarchies in the spread of influenza. *Science.* 2006;312:447-51. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1125237>
 22. **Stoddard ST, Wearing HJ, Reiner RC, Morrison AC, Astete H, Vilcarromero S, et al.** Long-term and seasonal dynamics of dengue in Iquitos, Peru. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e3003. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003003>
 23. **Simões TC, Codeço CT, Nobre AA, Eiras AE.** Modeling the non-stationary climate dependent temporal dynamics of *Aedes aegypti*. *PLoS One.* 2013;8:e64773. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0064773>
 24. **Cuong HQ, Hien NT, Duong TN, Phong TV, Cam NN, Farrar J, et al.** Quantifying the emergence of dengue in Hanoi, Vietnam: 1998-2009. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:e1322. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001322>
 25. **Azad S, Lio P.** Emerging trends of malaria-dengue geographical coupling in the Southeast Asia region. *J Vector Borne Dis.* 2014;51:165-71.
 26. **Grisales N, Poupardin R, Gómez S, Fonseca-González I, Ranson H, Lenhart A.** Temephos resistance in *Aedes aegypti* in Colombia compromises dengue vector control. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2438. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002438>
 27. **Ocampo CB, Salazar-Terreros MJ, Mina NJ, McAllister J, Brogdon W.** Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Trop.* 2011;118:37-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.01.007>
 28. **Instituto Nacional de Salud.** Mortalidad 1998-2011 y situación de salud en los municipios de frontera terrestre en Colombia. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia; 2013. p. 237.
 29. **Naish S, Dale P, Mackenzie JS, McBride J, Mengersen K, Tong S.** Climate change and dengue: A critical and systematic review of quantitative modelling approaches. *BMC Infect Dis.* 2014;14:167. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-14-167>
 30. **Focks DA, Haile DG, Daniels E, Mount GA.** Dynamic life table model for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Analysis of the literature and model development. *J Med Entomol.* 1993;30:1003-17. <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/30.6.1003>
 31. **Romero-Vega L, Pacheco O, de la Hoz-Restrepo F, Díaz-Quijano FA.** Evaluación de la notificación del dengue durante una epidemia, Colombia. *Rev Saúde Pública.* 2014;48:899-905. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-8910.2014048005321>
 32. **Zea D, Osorio L.** Situación del sistema de vigilancia de casos de dengue en un municipio de Colombia. *Rev Salud Pública (Bogotá).* 2011;13:785-95. <http://dx.doi.org/10.1590/S0124-00642011000500007>
 33. **Ramírez M, Lozano N, Huguett C, Florez L.** Informe preliminar de análisis de concordancia entre REPS y Sivigila. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2012.

ARTÍCULO ORIGINAL

Priorización de enfermedades virales zoonóticas en la interfaz de cerdos silvestres, cerdos domésticos y seres humanos

Diana Benavides-Arias¹, Diego Soler-Tovar²

¹ Semillero de Investigación Una Salud, Programa de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de Epidemiología y Salud Pública, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Para entender la ecología de las enfermedades es necesario comprender los agentes patógenos en la interfaz de vida silvestre y ganado. Los cerdos silvestres (*Sus scrofa*) constituyen un problema sanitario cuando se trata de prevenir y controlar las enfermedades zoonóticas, pues en ocasiones sus poblaciones son portadores de agentes infecciosos transmisibles a los cerdos domésticos y a otras especies animales, incluidos los seres humanos.

Objetivo. Priorizar las enfermedades zoonóticas en la interfaz de cerdos silvestres, animales domésticos y seres humanos.

Materiales y métodos. Se utilizó el método de priorización semicuantitativa basado en 27 criterios sustentados en publicaciones recientes, los cuales se clasificaron en las siguientes cinco categorías con base en la etiología viral: epidemiología (ocho), prevención y control (tres), economía y comercio (cuatro), salud pública (nueve) y sociedad (tres). A cada criterio se le adjudicó un coeficiente entre 0 y 7 de acuerdo con su impacto medido con base en la información científica (suma total de 189). La información sobre los criterios para las nueve enfermedades virales analizadas se recolectó mediante la revisión de 81 fuentes publicadas entre 1977 y 2015.

Resultados. Las tres enfermedades con mayor puntaje y potencial zoonótico fueron la influenza porcina (133), la hepatitis E (123) y la infección por hantavirus (103), y la mayor puntuación se observó en los criterios de epidemiología y salud pública.

Conclusión. Los métodos semicuantitativos de priorización son una fuente de información para la toma de decisiones, pero su utilización es poco frecuente en los países en desarrollo por la falta de datos de vigilancia en salud pública. El control de las enfermedades que afectan tanto a los seres humanos como a los animales silvestres, requiere el desarrollo de estrategias que reduzcan la transmisión de patógenos de estos a los animales domésticos y a los seres humanos.

Palabras clave: ecología, *Sus scrofa*, virus, zoonosis.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2950>

Prioritization of zoonotic viral diseases in feral pigs, domestic pigs and humans interface

Introduction: Understanding the ecology of diseases requires the comprehension of pathogens in wild life-livestock interface. Feral pigs (*Sus scrofa*) are a health problem when countries work to prevent and control zoonotic diseases, as their populations raise environmental and health concerns due to infectious agents transmissible to domestic pigs and other animal species, including humans.

Objective: To prioritize zoonotic diseases in the feral pigs, domestic animals and humans interface.

Materials and methods: The semi-quantitative prioritization method based on evidence included 27 criteria founded in recent publications. According to viral etiology we classified them in five categories: epidemiology (eight), prevention/control (three), economy/trade (four), public health (nine) and society (three). Each criterion had a coefficient of 0 to 7 according to their impact based on evidence (maximum sum of 189). Evidence on the criteria for the nine viral diseases analyzed came from the review of 81 sources published between 1977 and 2015.

Results: The top three diseases with the highest score and zoonotic potential were swine influenza (133), hepatitis E (123), and hantavirus infection (103), whose highest scores were observed on epidemiology and public health criteria.

Contribución de los autores:

Todos los autores participaron en las diferentes fases del desarrollo del estudio y en la redacción del artículo.

Conclusion: The semi-quantitative methods of prioritization impartially contribute to decision-making based on evidence; however, they are seldom used in developing countries due to the lack of data from public health surveillance. Control of shared diseases requires the development of strategies to reduce transmission of pathogens between wildlife and domestic animals and humans.

Key words: Ecology, *Sus scrofa*, viruses, zoonoses.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2950>

El control de las enfermedades infecciosas se dificulta por los escasos estudios sobre los procesos ecológicos que favorecen la transmisión entre los reservorios de fauna silvestre y las poblaciones de ganado, y la falta de comprensión por parte de los epidemiólogos y los responsables de las políticas de las complejas interacciones entre especies en los potenciales huéspedes de agentes patógenos y de la identificación de los factores de riesgo de enfermedades asociados a ellos. Para entender la ecología de las enfermedades, es necesario comprender los agentes patógenos involucrados en la interfaz de la vida silvestre y el ganado. La importancia de evaluar cómo las especies animales utilizan el entorno y el impacto de sus interacciones, es un factor determinante para establecer el riesgo local en la transmisión y la persistencia de las enfermedades infecciosas (1).

Debido a los brotes de enfermedades en especies amenazadas y la consecuente presencia de veterinarios, así como a los avances de la biología y la interacción entre huéspedes y parásitos, actualmente se presta mayor atención a las enfermedades de la fauna que constituyen una amenaza para los humanos, lo cual favorece los estudios encaminados a conocer mejor la interfaz del cerdo doméstico, el cerdo salvaje y los seres humanos (2).

Por otra parte, la mayoría de los agentes patógenos que afectan el ganado son capaces de infectar a otras especies de huéspedes, incluidas las de los animales de vida silvestre, por lo cual en las zonas donde la fauna silvestre y el ganado coexisten, dichos agentes patógenos pueden surgir y establecerse (3).

De igual manera, las enfermedades emergentes y reemergentes que afectan a los animales silvestres pueden transmitirse a las poblaciones humanas por contacto directo o por la acción de los vectores

(4). Según Gortázar, *et al.* (3), desde la perspectiva de la salud veterinaria, las enfermedades de notificación obligatoria que implican múltiples huéspedes, y las que han sido erradicadas o están casi bajo control, tienen el pronóstico más desfavorable; el contacto de animales silvestres con el ganado produce graves consecuencias para la salud y la economía.

Los procesos de priorización son una herramienta desarrollada específicamente para satisfacer las necesidades de las personas que trabajan en zonas donde los datos cuantitativos sobre las zoonosis son escasos y los vínculos entre los encargados de la salud humana y los responsables de la salud no operan de forma óptima. Los métodos semicuantitativos, cuyo uso depende de las preferencias individuales, ofrecen opciones para la clasificación mediante una escala numérica, en tanto que los métodos cuantitativos se basan en escalas numéricas diseñadas para reflejar los valores objetivos (por ejemplo, prevalencia o incidencia). Estos métodos, utilizados por diversos grupos de interés en países desarrollados, proporcionan una lista dinámica de zoonosis prioritarias que pueden ser objeto de investigación y de la asignación de fondos en busca del fortalecimiento de la colaboración entre las diversas partes interesadas en la prevención del riesgo (5).

La mayoría de las enfermedades infecciosas emergentes o reemergentes en los países desarrollados y en desarrollo, se origina en los animales, con más de 250 zoonosis documentadas en la literatura científica (6). Además de la aparición de agentes patógenos zoonóticos, se estima que 20 % de la morbilidad de todas las enfermedades humanas en los países menos desarrollados es atribuible a las zoonosis endémicas (7). En los países en desarrollo, 13 zoonosis se consideran como las de mayor impacto en los ganaderos pobres, con el agravante de que las enfermedades zoonóticas son un problema de salud pública, y se estima que son responsables de 2,7 millones de muertes y 2,4 millones de casos de enfermedad en seres humanos cada año; la mayoría de estas enfermedades también tienen efectos negativos sobre la producción ganadera (5).

Correspondencia:

Diana Benavides-Arias, Semillero de Investigación Una Salud, Universidad de La Salle, Carrera 7 N° 172-85, Bogotá, D. C., Colombia

Teléfono: (311) 547 8232

dbenavides29@unisalle.edu.co

Recibido: 02/07/15; aceptado: 03/12/15

El objetivo del presente estudio fue priorizar las enfermedades zoonóticas virales en la interfaz de cerdos silvestres (*Sus scrofa*), cerdos domésticos y seres humanos en Colombia, mediante una revisión sistemática de los sistemas de indexación y resumen (SIREs) en Colombia y de los datos del Sistema Mundial de Información Zoonosanitaria (*World Animal Health Information Database*, WAHID, y *World Animal Health Information System*, WAHIS), utilizando el método semicuantitativo de priorización basado en la evidencia.

Materiales y métodos

Mediante la consulta en el Sistema Mundial de Información Zoonosanitaria (WAHID y WAHIS) (<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/el-sistema-mundial-de-informacion-sanitaria/datos-despues-2004-wahid/>; <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/wahis-wild-interface/>), y en los sistemas de indexación y resúmenes (SIREs) Science Direct, Scopus, Google Scholar y PubMed (los cuales contenían información para la construcción de la matriz de categorías y criterios de priorización), de artículos indexados entre 1977 y 2015, y usando las palabras clave “priorización”, “cerdos silvestres” y “enfermedades virales” en inglés y en español, se indagó sobre las enfermedades zoonóticas y se elaboró una lista de nueve en las cuales los cerdos silvestres están involucrados como huéspedes o reservorios. La priorización semicuantitativa basada en la evidencia de las enfermedades virales se hizo según Humblet, *et al.* (8), Logan, *et al.* (5), y Cito, *et al.* (9), y se confrontó la información obtenida sobre las enfermedades zoonóticas de importancia a nivel internacional para detectar las más comunes.

Con base en la consulta documental, las enfermedades virales incluidas en la priorización fueron: la circovirus porcina, la hepatitis E, la enfermedad de Aujeszky (pseudorrabia), la peste porcina clásica, la parvovirus, el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*, PRRS), la peste porcina africana, la infección por hantavirus y la influenza porcina.

La distribución de los criterios múltiples entre las cinco categorías establecidas, fue la siguiente: epidemiología (EP), ocho criterios; prevención y control (PC), tres criterios; economía y comercio (EC), cuatro criterios; salud pública (PH), nueve criterios, y sociedad (SO), tres criterios (7) (cuadro 1).

Coefficientes de los criterios

Se asignó un coeficiente de 0 a 7, adaptado de Humblet, *et al.* (8), a cada criterio de acuerdo con su función, el efecto o la tasa. Los coeficientes se correlacionaron con la gravedad, es decir, cuanto mayor era el coeficiente, mayor o más grave era el efecto. Por ejemplo, a una tasa de letalidad de menos de 1 %, correspondía un coeficiente de 1, y a una de más de 90 %, uno de 7. A los agentes no zoonóticos se les asignó un coeficiente de 0, el cual representaba la ausencia de riesgo, en tanto que 1 y 2 correspondían a un riesgo mínimo, los valores intermedios de 3, 4 y 5 representaban riesgo pero sin que implicara peligro grave, y los coeficientes de 6 y 7 representaban la mayor probabilidad de riesgo (cuadro 1).

Resultados

Mediante la priorización semicuantitativa basada en la evidencia, se dio la puntuación por categoría de múltiples criterios para las enfermedades virales en el cerdo silvestre. En los cuadros 2, 3 y 4 se muestran los puntajes de las enfermedades virales prioritarias, clasificados como superiores, medios y bajos.

Según la priorización, las tres enfermedades zoonóticas con mayor puntuación (cuadros 2 y 5) en general y de acuerdo con la categoría (cuadro 6), fueron la influenza porcina (133), la hepatitis E (123) y la infección por hantavirus (103).

Las tres enfermedades priorizadas (influenza, hepatitis E e infección por hantavirus) presentaron los coeficientes de criterio más altos, con puntajes de 6 y 7, principalmente en las categorías de epidemiología y salud pública, lo cual se relacionó con una mayor exposición a los factores de riesgo que favorecen la presentación de la enfermedad. La priorización basada en la evidencia permitió asignar el coeficiente más alto de acuerdo con los criterios referidos a las características del huésped, a su sensibilidad a un agente patógeno presente en el ambiente, y a su interacción con las demás especies en el entorno.

En el caso de enfermedades como la peste porcina clásica, la circovirus y la parvovirus porcina (cuadro 3), mientras que en la categoría de epidemiología se registraron coeficientes entre 6 y 7, en la de salud pública los valores fueron de 1. Esto podría estar relacionado con los programas de prevención y control de enfermedades que adelantan las autoridades sanitarias en el país mediante estrategias como las zonas libres con vacunación, los programas de vacunación, y otras.

Cuadro 1. Descripción de las categorías y los criterios para la priorización semicuantitativa

Categoría	Criterio	Descripción
Epidemiología	1. Tasa de morbilidad	Ausencia de morbilidad: 0; tasa de morbilidad <1 %: coeficiente de 1; tasa de morbilidad <50 %: coeficiente de 4, y tasa de morbilidad >90 %: coeficiente de 7
	2. Tasa de mortalidad	Ausencia de mortalidad: 0; tasa de mortalidad <1 %: coeficiente de 1; tasa de mortalidad <50 %: coeficiente de 4, y tasa de mortalidad >90 %: coeficiente de 7
	3. Especificidad del patógeno	No se encuentra información reportada: 0. Si solo se presenta en el cerdo: 4. Si tiene múltiples huéspedes e involucra animales domésticos: 5. Si se presenta únicamente en el cerdo o en otras especies: 7. Salto entre especies, mayor valor: 7 Si involucra animales silvestres: 7.
	4. Modo de transmisión	Indirecta: 5 Horizontal: 7 Vertical: implica periodo de gestación: 6; directa: no necesita huésped intermediario, vector o reservorio: 7
	5. Persistencia en el ambiente	Sobreviven en el ambiente durante un periodo prolongado. Se inactiva rápidamente en el ambiente: 1. Horas: 3-4 Están en el ambiente pero sobreviven días: 7.
	6. Enfermedad clínica en cerdos	Sin signos: 0 Portadores: 1 Enfermedad subclínica: 4 Signos clínicos: 7
	7. Enfermedad clínica en animales silvestres	Sin signos: 0 Portadores: 1 Enfermedad subclínica: 4 Signos clínicos: 7
	8. Evidencia de circulación en Colombia	No hay datos: 1. Datos epidemiológicos en Colombia: 7
Prevención y control	1. Control de reservorio y vector	Asociado a modo de transmisión; para aquellas que tengan un modo de transmisión directo, el valor es 0. Se hace control efectivo: 1. No se hace control físico o químico del vector o agente: 7. Ningún control de reservorio o vector: 7
	2. Vacunación	El agente tiene vacuna: 1; el agente no tiene vacuna: 7.
	3. Tratamiento	El agente tiene tratamiento: 1; el agente no tiene tratamiento: 7.
Economía y comercio	1. Disminución de la productividad	Los animales domésticos no disminuyen su productividad: 0. Los animales domésticos disminuyen su productividad: 7.
	2. Limitaciones comerciales (importación-exportación)	Prohibición de exportación e importación: 7 Impacto no es tan drástico: 4. No hay limitación en el comercio exterior: 1.
	3. Impacto en sectores adyacentes (turismo)	No hay impacto en la industria del turismo: 1. Disminución de turistas nacionales e internacionales: 7
	4. Impacto zoonótico (costo de la enfermedad)	No hay reportes: 0. No hay evidencia de enfermedades en humanos: 1. Elevados costos de enfermedades zoonóticas: 7
Salud pública	1. Zoonosis	No es una enfermedad zoonótica: 1. Es una enfermedad zoonótica: 7.
	2. Clasificación de la zoonosis	Ciclozoonosis: 4; zooantroponosis: 7; antropozoonosis: 7; metazoonosis: 7
	3. Enfermedad conocida en humanos	Enfermedad desconocida en humanos: 0 Enfermedad conocida en humanos: 7
	4. Tasa de morbilidad	No hay morbilidad: 0; tasa de morbilidad <1 %: coeficiente de 1; tasa de morbilidad <50 %: coeficiente de 4, y tasa de morbilidad >90 %: coeficiente de 7
	5. Tasa de mortalidad	No hay mortalidad: 0; tasa de mortalidad <1 %: coeficiente de 1; tasa de mortalidad <50 %: coeficiente de 4, y tasa de mortalidad >90 %: coeficiente de 7
	6. Modo de transmisión	Indirecta: 5 Horizontal: 7 Vertical: implica periodo de gestación: 6 Directa: no necesita huésped intermediario, vector o reservorio: 7.
	7. Existencia de plan de control	Existe plan de control: 1. No existe plan de control: 7.
	8. Vacunación	Plan de vacunación: 1 No tiene plan de vacunación: 7.
	9. Tratamiento	Se hace tratamiento médico: 1. No se hace tratamiento médico: 7.
Sociedad	1. Disminución del consumo	Disminución del consumo de carne de cerdo: 7 No hay impacto negativo en la industria porcina: 1.
	2. Percepción del problema por parte del consumidor	No tiene conocimiento de las enfermedades que afectan al cerdo: 7. Conoce las enfermedades y microorganismos que afectan al cerdo: 1.
	3. Impacto en animales silvestres y en la biodiversidad	Impacto negativo en los animales silvestres: 7 No hay impacto en animales silvestres y biodiversidad: 0.

Cuadro 2. Puntuación alta de enfermedades virales con potencial zoonótico

Categoría	Criterio	Influenza	Referencia	Hepatitis E	Referencia	Infección por hantavirus	Referencia
Epidemiología	1. Tasa de morbilidad	7	(10)	7	(19)	0	
	2. Tasa de mortalidad	6	(10)	1	(20)	0	
	3. Especificidad del patógeno	7	(11)	7	(21)	5	(30)
	4. Modo de transmisión	7	(12)	7	(21)	7	(31)
	5. Persistencia en el medio ambiente	7	(13)	2	(20)	7	(32)
	6. Enfermedad clínica en cerdos	7	(11)	7	(22)	2	(31)
	7. Enfermedad clínica en animales silvestres	7	(11)	4	(23)	5	(33)
	8. Evidencia de circulación en Colombia	7	(14)	6	(24)	5	(4)
Prevención y control	1. Control de reservorio y vector			4	(20)	6	(30)
	2. Vacunación	1	(15)	3	(25)	7	(31)
	3. Tratamiento	0		4	(25)	7	(31)
Economía y comercio	1. Disminución de la productividad	4	(15)	1	(19)	3	(31)
	2. Limitaciones de importación-exportación	6	(16)	1	(19)	2	(33)
	3. Impacto en sectores adyacentes (turismo)	7	(11)	4	(19)	4	(31)
	6. Impacto zoonótico (costo de la enfermedad)	7	(11)	5	(26)	3	(33)
Salud pública	1. Zoonosis	7	(11)	7	(26)	7	(34)
	2. Clasificación de la zoonosis			7	(26)		
	3. Enfermedad conocida en humanos	7	(12)	7	(27)	6	(33)
	4. Tasa de morbilidad	2	(13)	5	(28)	6	(33)
	5. Tasa de mortalidad	6	(17)	2	(21)	5	(31)
	6. Modo de transmisión	7	(12)	5	(28)	7	(31)
	7. Hay plan de control	2	(16)	4	(29)	5	(31)
	8. Vacunación	1	(17)	1	(29)	1	(31)
	9. Tratamiento	2	(18)	7	(29)	2	(31)
Sociedad	1. Disminución del consumo	7	(16)	4	(29)	0	
	2. Percepción del problema por parte del consumidor	7	(17)	6	(29)	0	
	3. Impacto en animales silvestres y en la biodiversidad	5	(11)	5	(19)	1	(31)
Total		133		123		103	

Por último, enfermedades como la peste porcina africana, el síndrome respiratorio y reproductivo porcino, y la enfermedad de Aujeszky (cuadro 4), tuvieron coeficientes altos en categorías como la de epidemiología, pero en la categoría de salud pública se registraron valores de 0, lo cual evidencia que en Colombia estas tres enfermedades representan un riesgo mínimo para los cerdos domésticos, los cerdos silvestres y los seres humanos, ya que la presencia del agente está controlada o es una enfermedad considerada exótica (como es el caso de la peste porcina africana).

Discusión

La implementación de métodos de priorización para determinar el impacto de las enfermedades virales en la interfaz de cerdos silvestres, animales domésticos y seres humanos, es de vital importancia, ya que esta relación tiene consecuencias directas e indirectas sobre la transmisión de las enfermedades (9). En diversos estudios se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra

enfermedades virales zoonóticas en poblaciones de cerdos silvestres, entre ellos, contra el virus de la hepatitis E y el virus de la influenza porcina que, como se sabe, pueden transmitirse a las personas que están en estrecho contacto con estos animales (85).

El propósito de implementar el método de priorización de enfermedades es optimizar los recursos financieros y humanos para la vigilancia, la prevención, el control y la eliminación de las enfermedades infecciosas, en especial, para la detección temprana de cualquier enfermedad emergente, con base en el análisis y la puntuación de múltiples criterios, sobre todo de aquellos que determinan la importancia de los agentes patógenos (86).

En este análisis se incluyeron 27 criterios y en la lista de enfermedades se incluyeron algunas cuya circulación en el país no está documentada, por ejemplo, la enfermedad de Aujeszky (80) y la peste porcina africana (62), así como tres

Cuadro 3. Puntuación alta e intermedia de enfermedades virales con presencia en el país

Categoría	Criterio	Peste porcina clásica	Referencia	Circovirus	Referencia	Parvovirus	Referencia
Epidemiología	1. Tasa de morbilidad	3	(35)	7	(43)	5	(54)
	2. Tasa de mortalidad	7	(36)	4	(43)	3	(54)
	3. Especificidad del patógeno	7	(37)	5	(43)	4	(55)
	4. Modo de transmisión	7	(38)	7	(44)	7	(56)
	5. Persistencia en el medio ambiente	7	(39)	7	(44)	6	(55)
	6. Enfermedad clínica en cerdos	7	(40)	7	(45)	4	(57)
	7. Enfermedad clínica en animales silvestres	6	(40)	5	(46)	5	(58)
	8. Evidencia de circulación en Colombia	5	(37)	7	(47)	6	(59)
Prevención y control	1. Control de reservorio y vector	1	(41)	0	(45)	1	(56)
	2. Vacunación	0		1	(48)	1	(60)
	3. Tratamiento	7	(41)	3	(48)	5	(60)
Economía y comercio	1. Disminución de la productividad	5	(40)	7	(49)	6	(57)
	2. Limitaciones de importación-exportación	6	(42)	5	(50)	7	(55)
	3. Impacto en sectores adyacentes (turismo)	4	(35)	2	(50)	5	(58)
	6. Impacto zoonótico (costo de la enfermedad)	0		0		1	(57)
Salud pública	1. Zoonosis	0		1	(51)	1	(57)
	2. Clasificación de la zoonosis	0		1	(51)	1	(57)
	3. Enfermedad conocida en humanos	1	(42)	1	(52)	1	(57)
	4. Tasa de morbilidad	1	(35)	1	(52)	1	(57)
	5. Tasa de mortalidad	1	(35)	1	(52)	1	(57)
	6. Modo de transmisión	1	(38)	1	(52)	1	(57)
	7. Hay plan de control	1	(38)	1	(52)	1	(57)
	8. Vacunación	1	(38)	1	(52)	1	(57)
	9. Tratamiento	1	(38)	1	(52)	1	(57)
Sociedad	1. Disminución del consumo	4	(38)	4	(53)	4	(58)
	2. Percepción del problema por parte del consumidor	5	(38)	4	(53)	3	(55)
	3. Impacto en animales silvestres y en la biodiversidad	4	(38)	7	(46)	4	(57)
Total		92		91		86	

enfermedades con potencial zoonótico: la influenza porcina, la hepatitis E y la infección por hantavirus, las cuales obtuvieron el mayor puntaje en la priorización por lo que se proponen como prioridades para las actividades de gestión de riesgos (87).

El enfoque semicuantitativo basado en la evidencia utilizado en este estudio partió de una revisión de la literatura científica que permitió la ponderación independiente de los criterios para cada categoría, con el fin de establecer el valor del riesgo para cada enfermedad viral; el método puede aplicarse a otros ejercicios de clasificación de las zoonosis parasitarias o bacterianas (88).

Debido a la escasez de los datos disponibles, es necesario aplicar un enfoque que recurra a la opinión de expertos para obtener resultados consensuados que obtengan el respaldo de las partes interesadas en la priorización (89-91). Por ello, el presente estudio se debe continuar con la confrontación de los resultados obtenidos y con la búsqueda del consenso de los expertos.

Los animales domésticos que comparten enfermedades con los animales silvestres pueden tener un impacto negativo en la salud humana, en la economía y en la conservación de la fauna silvestre, así como en el mantenimiento de una infección. Por otra parte, las enfermedades compartidas representan una carga significativa para la salud pública, las economías mundiales y la conservación de la biodiversidad (92), en tanto que las enfermedades virales representan una amenaza para la eficiencia de los sistemas productivos, ya que los virus que infectan a los cerdos domésticos también son capaces de infectar a los cerdos silvestres (93).

Es importante tener en cuenta los aspectos que se refieren a la naturaleza de la infección individual en los animales, la dinámica de la infección en la población y su distribución geográfica, así como la interacción de los reservorios de vida silvestre con los animales domésticos. La presentación de la enfermedad en cada especie involucrada debe ser examinada, así como las interacciones entre el medio natural y las especies domésticas (94).

Cuadro 4. Puntuación baja de enfermedades virales

Categoría	Criterio	Peste porcina africana	Referencia	PRRS	Referencia	Enfermedad de Aujeszky	Referencia
Epidemiología	1. Tasa de morbilidad	7	(61)	7	(70)	3	(74)
	2. Tasa de mortalidad	7	(61)	7	(70)	3	(74)
	3. Especificidad del patógeno	5	(62)	7	(70)	4	(74)
	4. Modo de transmisión	7	(63)	7	(56)	7	(75)
	5. Persistencia en el medio ambiente	3	(56)	6	(71)	6	(76)
	6. Enfermedad clínica en cerdos	4	(63)	7	(56)	2	(77)
	7. Enfermedad clínica en animales silvestres	7	(64)	6	(56)	6	(78)
	8. Evidencia circulación en Colombia	1	(62)	4	(72)	1	(79)
Prevención/control	1. Control de reservorio/ vector	6	(65)	1	(70)	1	(80)
	2. Vacunación	1	(66)	0		1	(75)
	3. Tratamiento	6	(66)	3	(73)	7	(81)
Economía y comercio	1. Disminución de la productividad	5	(67)	4	(73)	6	(82)
	2. Limitaciones de importación-exportación	1	(56)	5	(73)	7	(83)
	3. Impacto en sectores adyacentes (turismo)	4	(67)	3	(56)	4	(82)
	6. Impacto zoonótico (costo de la enfermedad)	1	(68)	0		0	
Salud pública	1. Zoonosis	0		0		0	(84)
	2. Clasificación de la zoonosis	0		0		0	(84)
	3. Enfermedad conocida en humanos	0		0		0	(84)
	4. Tasa de morbilidad	0		0		0	(79)
	5. Tasa de mortalidad	0		0		0	(79)
	6. Modo de transmisión	0		0		0	(79)
	7. Presencia de plan de control	0		0		0	(79)
	8. Vacunación	0		0		0	(79)
	9. Tratamiento	0		0		0	(79)
Sociedad	1. Disminución del consumo	3	(69)	2	(56)	4	(80)
	2. Percepción del problema por parte del consumidor	4	(67)	2	(73)	2	(82)
	3. Impacto en animales silvestres y la biodiversidad	6	(67)	5	(56)	5	(82)
Total		77		76		69	

PRRS: *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome***Cuadro 5.** Valores de los criterios de evaluación de las enfermedades virales

Enfermedad	Suma de criterios
Valor alto	
1. Influenza porcina	133
2. Hepatitis E	123
3. Infección por hantavirus	103
Valor intermedio	
4. Peste porcina clásica	92
5. Circovirus	91
6. Parvovirus	86
Valor bajo	
7. Peste porcina africana	77
8. Síndrome reproductivo y respiratorio porcino	76
9. Enfermedad de Aujeszky	69

En este sentido, Corner (94) indica que una población de animales infectados se puede clasificar como huésped de mantenimiento o diseminadora del virus, dependiendo de la dinámica de la infección. En los reservorios la infección puede persistir por transmisión intraespecífica y, también, puede ser fuente de infección para otras especies. El estado de mantenimiento y propagación del huésped determina si es necesario el control de

cada especie de huéspedes para la prevención y el control de la enfermedad, y para la predicción de la presencia continua de la infección en la especie una vez que se elimine la fuente de infección. Sin embargo, la demografía y el comportamiento de las poblaciones desempeñan un papel importante en la transmisión de patógenos intraespecíficos e interespecíficos, y determinan las tasas de contacto y la exposición al ambiente (95).

A este respecto, la densidad de la población de cerdos silvestres en el ámbito mundial está en ascenso, lo que significa un mayor número de reservorios disponibles para diseminar la enfermedad, así como altas tasas de contacto entre huéspedes (96). En cuanto al papel del cerdo silvestre como reservorio de enfermedades virales y de los cerdos domésticos en las enfermedades priorizadas (influenza porcina, hepatitis E y hantavirus), las características ecológicas y la distribución de agentes virales son de importancia para las intervenciones en salud pública; además, los métodos para priorizar las situaciones de salud humana y animal son un instrumento útil para comprender mejor los efectos de las enfermedades virales en la dinámica de la población de cerdos

Cuadro 6. Principales enfermedades priorizadas según la categoría con mayor puntuación de criterios

Categoría	Criterio	Influenza porcina	Hepatitis E	Infección por hantavirus
Epidemiología	1. Tasa de morbilidad	7	7	0
	2. Tasa de mortalidad	6	1	0
	3. Especificidad del patógeno	7	7	5
	4. Modo de transmisión	7	7	7
	5. Persistencia en el medio ambiente	7	2	7
	6. Enfermedad clínica en cerdos	7	7	2
	7. Enfermedad clínica en animales silvestres	7	4	5
	8. Evidencia circulación en Colombia	7	6	5
Salud pública	1. Zoonosis	7	7	7
	2. Clasificación de la zoonosis	0	7	0
	3. Enfermedad conocida en humanos	7	7	6
	4. Tasa de morbilidad	2	5	6
	5. Tasa de mortalidad	6	2	5
	6. Modo de transmisión	7	5	7
	7. Existencia de plan de control	2	4	5
	8. Vacunación	1	1	1
	9. Tratamiento	2	7	2

silvestres y la circulación de agentes patógenos en las poblaciones de cerdos domésticos y de humanos (93).

Si bien es cierto que la influenza porcina se considera una zoonosis, y que los cerdos pueden actuar como un reservorio intermedio para el virus de la influenza aviar, potencialmente infeccioso para los humanos, es necesario comprender la interacción de los cerdos silvestres, los cerdos domésticos y los seres humanos en el caso de este tipo de virus, el cual, además, se relaciona con las particularidades del sistema inmunitario porcino (97).

En el contexto nacional, el Instituto Nacional de Salud, entidad encargada de operar y fortalecer el sistema de vigilancia y análisis del riesgo en salud pública, vigila enfermedades de impacto en la salud pública que el hombre comparte con los animales como son los accidentes ofídicos y causados por animales ponzoñosos, la rabia y las agresiones de animales potencialmente transmisores de rabia, la brucelosis, las enfermedades priónicas, las encefalitis equinas, la leptospirosis, la peste, la rabia y el tífus, pero las tres enfermedades zoonóticas priorizadas no están sujetas a esta vigilancia (98).

En cuanto al virus animal de la hepatitis E, identificado en los cerdos domésticos, en los cerdos silvestres y en los ciervos, su potencial zoonótico ha generado una gran preocupación en los países industrializados y en desarrollo. Es claro que la mayoría de las infecciones por el virus de la hepatitis E, no solo se adquieren por viajar a zonas donde es endémica. La infección por este virus se

consideró inicialmente endémica, principalmente en los países en desarrollo; sin embargo, hoy se sabe que es la presentación de hepatitis viral más grave en todo el mundo por su naturaleza zoonótica, a lo que se añaden los casos recientemente reportados de infección crónica, por lo cual se requiere el control de este virus (99).

Los hantavirus, reportados recientemente en el continente americano, son otro ejemplo de agentes zoonóticos que causan morbilidad y mortalidad en humanos y requieren respuestas rápidas y oportunas basadas en el trabajo interdisciplinario de médicos, veterinarios y biólogos (100).

El conocimiento de las enfermedades que circulan en poblaciones de vida silvestre puede ser importante, no solo para la conservación de la fauna y la producción de cerdos domésticos, sino también para la salud pública, ya que las enfermedades zoonóticas plantean una importante amenaza para la salud humana y, por lo tanto, deben tenerse en cuenta por ser causantes de enfermedades graves y de la disminución o pérdida de la producción en los animales productores de alimentos, o de mortalidad en los animales silvestres, lo que puede conducir a la disminución de especies y al desequilibrio ecológico (101).

En Colombia, el sistema de vigilancia de las zoonosis adolece de un subregistro de casos humanos de zoonosis, así como de la falta de políticas de salud pública veterinaria, y de sistemas de vigilancia epidemiológica débiles y fragmentados. La falta de redes de laboratorios (102) es un agravante para la identificación y el tratamiento de

las enfermedades virales en la interfaz de cerdos silvestres, cerdos domésticos y seres humanos. La transmisión de microorganismos patógenos puede darse como resultado del movimiento de animales silvestres y animales domésticos entre hábitats, lo cual ocurre en sitios en los que convergen estas especies con el hombre, en áreas protegidas o en áreas comunes que constituyen un punto de confluencia de patógenos oportunistas involucrados en la presentación de enfermedades, y cuya composición, diversidad y densidad afectan el desarrollo natural de las especies en cuanto a la interacción con su entorno. De ahí la importancia de entender esta interfaz y el mecanismo de transmisión de patógenos en las áreas comunes para los animales domésticos, los animales silvestres y los seres humanos, con el fin de analizar el riesgo local y global que implican (103).

La relación entre la salud y la enfermedad en los humanos, los animales y los ecosistemas, y sus implicaciones en la transmisión de las enfermedades zoonóticas, requieren de un enfoque coordinado y colaborativo, multidisciplinario e intersectorial en el que los sectores involucrados compartan responsabilidades, y aporten su conocimiento para identificar y disminuir las enfermedades humanas y animales, apoyados en el intercambio de información sobre estas, su epidemiología y los riesgos que entrañan (104).

En el presente estudio se proporciona un instrumento útil para identificar y priorizar las enfermedades virales en la interfaz de cerdos silvestres, cerdos domésticos y seres humanos, así como de zoonosis importantes, y para priorizarlas. Los métodos semicuantitativos son útiles frente a las múltiples dimensiones y ajustes de prioridades que deben cuantificarse y valorarse. El estudio, no obstante, tiene limitaciones debido a los pocos datos disponibles y a la naturaleza inespecífica del diagnóstico clínico. De todas maneras, la evaluación de los datos reportados suministra información de calidad para una mejor comprensión de los riesgos en salud pública, lo cual es de utilidad para asignar recursos en países en desarrollo. Si bien es cierto que los recursos económicos son limitados, podrían generar beneficios en investigaciones e intervenciones de enfermedades que a menudo se encuentran desatendidas. El método propuesto tiene limitaciones por el gran número de enfermedades comunes en los cerdos silvestres que no se analizan, pues no se hace vigilancia de

estos animales y la detección de signos clínicos o la confirmación de una enfermedad es un proceso dispendioso (105,106).

Si bien el Instituto Colombiano Agropecuario diseña y ejecuta programas oficiales para controlar y erradicar enfermedades endémicas de prioridad nacional que involucran a estas especies, la principal enfermedad porcina vigilada es la peste porcina clásica (107).

Los métodos semicuantitativos para priorizar enfermedades aportan datos imparciales para la toma de decisiones, pero se utilizan poco en los países en desarrollo por la carencia de datos de la vigilancia en salud pública. El control de enfermedades compartidas con la vida silvestre requiere el desarrollo de estrategias que reduzcan la transmisión de agentes patógenos entre la vida silvestre, los animales domésticos y los seres humanos. La vigilancia sanitaria de la fauna silvestre es tan relevante como la de los animales domésticos, y debe llevarse a cabo mediante la colaboración de los sectores encargados del control y la prevención de enfermedades zoonóticas.

En el contexto actual de variabilidad y cambio climático, deforestación, aumento de las especies amenazadas, sobrepoblación, expansión de las fronteras agrícolas, pecuarias y urbanísticas, y problemas que afectan a todo el mundo, es necesario adoptar una visión diferente, enfocada en las nuevas tendencias impuestas en las prácticas de producción animal por la globalización de la industria alimentaria. Teniendo en cuenta las situaciones sociales en las que son cada vez más acentuados los cambios demográficos, como aumento de la población, desplazamiento, movilización y urbanización, así como los cambios en los patrones de las poblaciones de animales silvestres, se deben implementar mejores sistemas de vigilancia epidemiológica, y nuevos enfoques para el control y la prevención en el marco de la relación entre la salud animal y la humana.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no tenemos intereses económicos o personales relacionados con los resultados publicados en este artículo.

Financiación

Este estudio fue financiado con recursos del semillero de investigación "Una salud" y el Grupo de Epidemiología y Salud Pública de la Universidad de La Salle.

Referencias

1. Barasona JA, Latham MC, Acevedo P, Armenteros JA, Latham AD, Gortázar C, *et al.* Spatiotemporal interactions between wild boar and cattle: Implications for cross-species disease transmission. *Vet Res.* 2014;45:1-122. <http://dx.doi.org/10.1186/s13567-014-0122-7>
2. Gortázar C, Díez-Delgado I, Barasona JA, Vicente J, De La Fuente J, Boadella M. The wild side of disease control at the wildlife-livestock-human interface: A review. *Front Vet Sci.* 2015;1:27. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2014.00027>
3. Gortázar C, Ferroglio E, Höfle U, Frölich K, Vicente J. Diseases shared between wildlife and livestock: A European perspective. *Eur J Wild Res.* 2007;53:241-56. <http://dx.doi.org/10.1007/s10344-007-0098-y>
4. Monsalve S, Mattar S, González M. Zoonosis transmitidas por animales silvestres y su impacto en las enfermedades emergentes y reemergentes. *Rev MVZ Córdoba.* 2009;14:1762-73.
5. Logan-Rist C, Arriola C, Rubin C. Prioritizing zoonoses: A proposed one health tool for collaborative decision-making. Centers for Disease Control and Prevention. *PLoS ONE.* 2014;9:e109986. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0109986>
6. Jones K, Patel N, Levy M, Storeygard A. Global trends in emerging infectious disease. *Nature.* 2008;451:990-3. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06536>.
7. Jones B, McKeever D, Grace D, Pfeiffer D, Mutua F, Njuki J, *et al.* Zoonoses (Project 1). Wildlife/domestic livestock interactions. Nairobi: International Livestock Research Institute; 2011. p. 128.
8. Humblet MF, Vandeputte S, Albert A, Gosset C, Kirschvink N, Haubruge E, *et al.* Multidisciplinary and evidence-based method for prioritizing diseases of food-producing animals and zoonoses. *Emerg Infect Dis.* 2012;18. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1804.111151>
9. Cito F, Rijks J, Rantsios A, Cunningham A, Baneth G, Guardabassik L, *et al.* Prioritization of companion animal transmissible diseases for policy intervention in Europe. *J Comp Pathol.* 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.01.007>
10. Arbeláez G, Calderón D, Rincón M, Lora A, Mercado M. Improvement of two diagnostics methods for detection of influenza swine virus. *Univ Sci.* 2008;3:65-74.
11. Vittecoq M, Grandhomme V, Simon G, Herve S, Blanchon T, Renaud F, *et al.* Study of influenza A virus in wild boars living in a major duck wintering site. *Infect Genet Evol.* 2012;12:483-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.003>
12. Brown I. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol.* 2000;74:29-46. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00164-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00164-4)
13. Baratelli M, Córdoba L, Pérez L, Maldonado J, Fraile L, Núñez J, *et al.* Genetic characterization of influenza A viruses circulating in pigs and isolated in north-east Spain during the period 2006–2007. *Res Vet Sci.* 2014;96:380-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.12.006>
14. Hanssen H, Hincapié O, López J. Influenza en porcinos de Antioquia, Colombia. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1977;82:35-43.
15. Rajao D, Anderson T, Gauger P, Vincent A. Pathogenesis and vaccination of influenza A virus in swine. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014;1:307-26. http://dx.doi.org/10.1007/82_2014_391
16. Lester P, Perera C, Coronado L, Ríos L, Vega A, Frías M, *et al.* Molecular epidemiology study of swine influenza virus revealing a reassorted virus H1N1 in swine farms in Cuba. *Prev Vet Med.* 2015;119:172-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.02.013>
17. Alfonso P. Amenazas y oportunidades de reducción de riesgos por virus influenza en la interface animal-hombre. *Rev Salud Anim.* 2010;32:1-10.
18. Calore E, Uipc D, Pérez N. Pathology of the swine-origin influenza A (H1N1) flu. *Pathol Res Pract.* 2011;207:86-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2010.11.003>
19. Kumar S, Subhadra S, Singh B, Panda B. Hepatitis E virus: The current scenario. *Int J Infect Dis.* 2012;17:228-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2012.11.026>
20. Di Bartolo I, Angeloni G, Ponterio E, Ostanello F, Ruggeri F. Detection of hepatitis E virus in pork liver sausages. *Int J Food Microbiol.* 2015;193:29-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.005>
21. Martelli F, Caprioli A, Zengarini M, Marata A, Fiegna C, Di Bartolo I, *et al.* Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Vet Microbiol.* 2008;26:74-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.07.004>
22. Nilsa D, Seminati C, Pina S, Mateu E, Martín M, Segalés J. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet Microbiol.* 2007;119:105-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.08.027>
23. Banks M, Bendall R, Grierson S, Heath G, Mitchell J, Dalton H. Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:953-5. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1005.030908>
24. Gutiérrez-Vergara C, Quintero J, Duarte JF, Suescún JP, López-Herrera A. Detection of hepatitis E virus genome in pig livers in Antioquia, Colombia. *Genet Mol Res.* 2015;14:2890-1. <http://dx.doi.org/10.4238/2015.March.31.20>
25. Sanford B J, Opriessnig T, Kenney SP, Dryman BA, Córdoba L, Meng XJ. Assessment of the cross-protective capability of recombinant capsid proteins derived from pig, rat, and avian hepatitis E viruses (HEV) against challenge with a genotype 3 HEV in pigs. *Vaccine.* 2012;30:6249-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.08.013>
26. Song W, Xianfeng C, Xing D, Chen D, Mingjie X, Jiahong L, *et al.* Rabbit and human hepatitis E virus strains belong to a single serotype. *Virus Res.* 2013;6:101-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.05.013>
27. Montalvo M, Canwat-Owot J, Correia B, Bello M, Flaquet P, Sariego S, *et al.* Hepatitis E virus genotype 3 in humans and swine, Cuba. *Infect Genet Evol.* 2013;14:335-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.12.022>
28. Oliveira-Filho EF, Bank-Wolf BR, Thiel HJ, König M. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus in domestic swine and wild boar in Germany. *Vet Microbiol.* 2014;174:233-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.09.011>

29. **Quintana-González A.** Virus de la hepatitis E. *Rev Biomed.* 2003;14:165-89.
30. **Ramos C.** Los hantavirus causantes de la fiebre hemorrágica con síndrome renal y del síndrome pulmonar. *Salud Pública Méx.* 2008;50:334-40.
31. **Harkness JE, Turner PV, Vandewoude S, Wheler CL.** Harkness and Wagner's Biology and Medicine of Rabbits and Rodents. Fifth edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2013.
32. **Hart C, Bennett M.** Hantavirus infections: Epidemiology and pathogenesis. *Microbes Infect.* 1999;1:1229-37. [http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(99\)00238-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(99)00238-5)
33. **Mitchell M, Tully TN Jr.** Zoonotic diseases. En: Quesenberry K, Carpenter J, editors. *Ferrets, Rabbits and Rodents.* Third edition. St. Louis, MO: Elsevier; 2012. p. 557-65. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4160-6621-7.18001-7>
34. **Cook R, Karesh W.** Emerging diseases at the interface of people, domestic animals, and wildlife. En: Miller E, Fowler M, editors. *Fowler's zoo and wild animal medicine current therapy.* First edition. St. Louis, MO: Elsevier Saunders; 2011. p. 136-46. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4377-1986-4.00018-4>
35. **Boklund A, Goldbach S, Uttenthal A, Alban L.** Simulating the spread of classical swine fever virus between a hypothetical wild-boar population and domestic pig herds in Denmark. *Prev Vet Med.* 2008;85:187-206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.01.012>
36. **Moennig V, Floegel-Niesmann G, Greiser-Wilke I.** Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: A review of new knowledge. *Vet J.* 2003;165:11-20. [http://dx.doi.org/10.1016/S1090-0233\(02\)00112-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1090-0233(02)00112-0)
37. **Ferrer E, Fonseca O, Percedo M, Abeledo M.** Classical swine fever in the Americas and the Caribbean. Present situation and prospects for control and eradication. *Rev Salud Anim.* 2010;32:11-21.
38. **Sawford K, Geong M, Bulu P, Drayton E, Mahardika G, Leslie E, et al.** An investigation of classical swine fever virus seroprevalence and risk factors in pigs in East Nusa Tenggara, eastern Indonesia. *Prev Vet Med.* 2015;119:190-202. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.02.002>
39. **Instituto Colombiano Agropecuario.** Colombia, Sanidad Animal, 2005. Fecha de consulta: 24 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/getattachment/4b322f44-1380-4481-84c9-cf5078cd14f8/1.aspx>
40. **Simon G, Le Dimna M, Le Potier MF, Pol F.** Molecular tracing of classical swine fever viruses isolated from wild boars and pigs in France from 2002 to 2011. *Vet Microbiol.* 2013;166:631-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.032>
41. **Blome S, Grotha I, Moennig V, Greiser-Wilke I.** Classical swine fever virus in South-Eastern Europe –Retrospective analysis of the disease situation and molecular epidemiology. *Vet Microbiol.* 2010;146:276-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.035>
42. **Lévai R, Barna T, Fábíán K, Blome S, Belák K, Bálint Á, et al.** Pre-registration efficacy study of a novel marker vaccine against classical swine fever on Maternally Derived Antibody negative (MDA-) target animals. *Biologicals.* 2015;43:92-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2014.12.004>
43. **Alarcón P, Rushton J, Wieland B.** Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England –An economic disease model. *Prev Vet Med.* 2013;110:88-102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.02.010>
44. **Darwich L, Mateu E.** Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 2012;164:61-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.12.003>
45. **Pujols J, Lorca-Oró C, Díaz C, Russell L, Campbell J, Crenshaw D, et al.** Commercial spray-dried porcine plasma does not transmit porcine circovirus type 2 in weaned pigs challenged with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet J.* 2011;190:e16-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.02.021>
46. **Knell S, Willems H, Hertrampf B, Reine G.** Comparative genetic characterization of porcine circovirus type 2 samples from German wild boar populations. *Vet Microbiol.* 2005;109:169-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.06.004>
47. **Díaz I, Cortey M, Darwich L, Sibila M, Mateu E, Segalés J.** Subclinical porcine circovirus type 2 infection does not modulate the immune response to an Aujeszky's disease virus vaccine. *Vet J.* 2012;194:84-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.02.014>
48. **Grau-Roma L, Fraile L, Segalés J.** Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet J.* 2011;187:23-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.01.018>
49. **Vidigal P, Mafra CL, Silva FM, Fietto JL, Silva-Júnior A, Almeida MR.** Tripping over emerging pathogens around the world: A phylogeographical approach for determining the epidemiology of porcine circovirus-2 (PCV-2), considering global trading. *Virus Res.* 2012;163:320-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.019>
50. **Rose N, Eveno N, Grasland B, Nignol A, Oger A, Jestin A, et al.** Individual risk factors for Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in pigs: A hierarchical Bayesian survival analysis. *Prev Vet Med.* 2009;90:168-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.04.010>
51. **Burbelo P, Ragheb JA, Kapoor A, Zhang Y.** The serological evidence in humans supports a negligible risk of zoonotic infection from porcine circovirus type 2. *Biologicals.* 2013;41:430-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.09.005>
52. **Hattermann K, Roedner C, Schmitt C, Finsterbusch T, Steinfeldt T, Mankertz A.** Infection studies on human cell lines with porcine circovirus type 1 and porcine circovirus type 2. *Xenotransplantation.* 2004;11:284-94. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3089.2004.00134.x>
53. **Roca M, Gimeno M, Bruguera S, Segalés J, Díaz I, Galindo-Cardiel IJ, et al.** Effects of challenge with a virulent genotype II strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on piglets vaccinated with an attenuated genotype I strain vaccine. *Vet J.* 2012;193:92-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.11.019>
54. **Mengeling W, Lager K, Vorwald A.** The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Anim Reprod Sci.* 2000;60:199-210. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00135-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00135-4)

55. **Borralló G, Guillermo M, Sánchez J.** Parvovirus porcino. *Mundo Ganadero*. 1993;11:65-8.
56. **Ruiz-Fons F, Segalés J, Gortázar CH.** A review of viral diseases of the European wild boar: Effects of population dynamics and reservoir role. *Vet J*. 2007;176:158-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.02.017>
57. **Cadar D, Kiss T, Ádám D, Cságola A, Novosel D, Tuboly T.** Phylogeny, spatio-temporal phylodynamics and evolutionary scenario of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) in wild boars: Fast dispersal and high genetic diversity. *Vet Microbiol*. 2013;166:200-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.010>
58. **Fenati M, Armaroli E, Corrain R, Guberti V.** Indirect estimation of porcine parvovirus maternal immunity decay in free-living wild boar (*Sus scrofa*) piglets by capture-recapture data. *Vet J*. 2009;180:262-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.009>
59. **Rico S, Molina S, Pabón F.** Detección y aislamiento del parvovirus porcino en Medellín, Colombia. *Rev Col Cienc Pec*. 2003;16:40-4.
60. **Antonis A, Bruschke C, Rueda P, Maranga L, Casal J, Vela C, et al.** A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine*. 2006;24:5481-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.03.089>
61. **Carvalho H, Zúquete S, Wijnveld M, Weesendorp E, Jongejan F, Stegeman A, et al.** No evidence of African swine fever virus replication in hard ticks. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014;5:582-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.12.012>
62. **Blome S, Gabriel C, Beer M.** Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Res*. 2013;173:122-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.026>
63. **Blome S, Gabriel C, Beer M.** Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. *Vaccine*. 2014;32:3879-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.051>
64. **Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Martínez-López B.** African swine fever: An epidemiological update. *Transbound Emerg Dis*. 2012;59:27-35. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01293.x>
65. **Gogin A, Gerasimov V, Malogolovkin A, Kolbasov D.** African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007–2012. *Virus Res*. 2013;173:198-203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.007>
66. **Oura C, Edwards L, Batten C.** Virological diagnosis of African swine fever—Comparative study of available tests. *Virus Res*. 2013;173:150-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.022>
67. **Gavier-Widén D, Gortázar C, Stahl K, Neimanis AS, Rossi S, Hard AF, Segerstad C, et al.** African swine fever in wild boar in Europe: A notable challenge. *Vet Rec*. 2015;176:199-200. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.h699>
68. **World Organisation for Animal Health (OIE).** Peste porcina africana. Fecha de consulta: 28 de abril de 2015. Disponible en: <http://www.oie.int/doc/ged/D13954.PDF>
69. **Ruiz-Fons F.** A review of the current status of relevant zoonotic pathogens in wild swine (*Sus scrofa*) populations: Changes modulating the risk of transmission to humans. *Transbound Emerg Dis*. 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12369>
70. **Schelkopf A, Nerem J, Cowles B, Amodie D, Swalla R, Dee R.** Reproductive, productivity, and mortality outcomes in late-gestation gilts and their litters following simulation of inadvertent exposure to a modified-live vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vaccine*. 2014;32:4639-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.073>
71. **Sutherland M, Niekamp S, Johnson R, van Alstine W, Salak-Johnson J.** Heat and social rank impact behavior and physiology of PRRS-virus-infected pigs. *Physiol Behav*. 2006;90:73-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.029>
72. **Cruz MC.** Prevalencia serológica del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en cerdos de explotaciones extensivas de Colombia. *Rev Med Vet Zoot*. 2006;53:33-41.
73. **Food and Agriculture Organization, FAO.** EMPRES Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales. Fecha de consulta: 28 de abril de 2015. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/011/i0574s/i0574s00.HTM>
74. **Verpoest S, Brigitte C, De Regge N.** Molecular characterization of Belgian pseudorabies virus isolates from domestic swine and wild boar. *Vet Microbiol*. 2014;172:72-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.05.001>
75. **Maresch C, Lange E, Teifke J, Fuchs W, Klupp B, Müller T, et al.** Oral immunization of wild boar and domestic pigs with attenuated live vaccine protects against Pseudorabies virus infection. *Vet Microbiol*. 2012;161:20-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.002>
76. **Del Rincón J.** Enfermedad de Aujeszky: descripción y consideraciones. *Mundo Ganadero*. 1996;81:42-4.
77. **Gerdts V, Jöns A, Mettenleiter T.** Potency of an experimental DNA vaccine against Aujeszky's disease in pigs. *Vet Microbiol*. 1999;66:1-13. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00300-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00300-9)
78. **Albina E, Mesplède A, Chenut G, Le Potier M, Bourbao G, Le Gal S, et al.** A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Vet Microbiol*. 2000;77:43-57. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00255-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00255-8)
79. **Rodríguez D, Naranjo J, Rincón M, Peña M.** Estudio serológico de Aujeszky en las principales regiones porcícolas del país. *Porcicultura Colombiana*. 2013;2:24-7.
80. **Gillespie RR, Hill MA.** Infection of pigs by aerosols of Aujeszky's disease virus and their shedding of the virus. *Res Vet Sci*. 1996;60:228-33. [http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288\(96\)90044-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288(96)90044-2)
81. **Müller T, Teuffert J, Zellmer R, Conraths FJ.** Experimental infection of European wild boars and domestic pigs with pseudorabies viruses with differing virulence. *Am J Vet Res*. 2001;62:252-8. <http://dx.doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.252>
82. **Moreno A, Sozzi E, Grilli G, Gibelli L, Gelmetti D, de Lelli D, et al.** Detection and molecular analysis of Pseudorabies virus strains isolated from dogs and a wild boar in Italy. *Vet Microbiol*. 2015;177:359-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.04.001>

83. **Boklund A, Dahl J, Alban L.** Assessment of confidence in freedom from Aujeszky's disease and classical swine fever in Danish pigs based on serological sampling - Effect of reducing the number of samples. *Prev Vet Med.* 2012;110: 214-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.11.027>
84. **Boelaert F, Deluyker H, Maes D, Godfroid J, Raskin A, Vairewijck H, et al.** Prevalence of herds with young sows seropositive to pseudorabies (Aujeszky's disease) in northern Belgium. *Prev Vet Med.* 1999;41:239-55. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5877\(99\)00058-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5877(99)00058-6)
85. **Meng X, Lindsay D, Sriranganathan N.** Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009;27:364;2697-707. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2009.0086>
86. **Kurowicka D, Bucura C, Cooke R, Havelaar A.** Probabilistic inversion in priority setting of emerging zoonoses. *Risk Anal.* 2010;30:715-23. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1539-6924.2010.01378>
87. **Havelaar AH, van Rosse F, Bucura C, Toetenel MA, Haagsma JA.** Prioritizing emerging zoonoses in the Netherlands. *PLoS ONE.* 2010;5:e13965. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013965>
88. **Cardoen S, van Huffel X, Berkvens D, Quoilin S, Ducoffre G, Saegerman C, et al.** Evidence-based semiquantitative methodology for prioritization of foodborne zoonoses. *Foodborne Pathog Dis.* 2009;6:1083-96. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2009.0291>
89. **Jenicek M.** Epidemiology, evidenced-based medicine, and evidence-based public health. *J Epidemiol.* 1997;7:187-97. <http://dx.doi.org/10.2188/jea.7.187>
90. **López J.** Sobre la salud pública basada en pruebas. *Rev Esp Salud Pública.* 2008;82:1-4.
91. **Ciliberti A, Gavier-Widén D, Yon L, Hutchings M, Artois M.** Prioritisation of wildlife pathogens to be targeted in European surveillance programmes: Expert-based risk analysis focus on ruminants. *Prev Vet Med.* 2015;118:271-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.11.021>
92. **Daszak P, Cunningham A, Hyatt A.** Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. *Science.* 2000;287:443-9. <http://dx.doi.org/10.1126/science.287.5452.443>
93. **Ruiz-Fons F, Vicente J, Vidal D, Höfle U, Villanúa D, Gauss C, et al.** Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: The effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology.* 2008;65:731-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.07.001>
94. **Corner L.** The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Vet Microbiol.* 2006;112:303-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.015>
95. **Dobson A.** Population dynamics of pathogens with multiple host species. *Am Nat.* 2004;164:64-78. <http://dx.doi.org/10.1086/424681>
96. **Acevedo P, Vicente J, Hofle U, Cassinello J, Ruiz-Fons F, Gortázar C.** Estimation of European wild boar relative abundance and aggregation: A novel method in epidemiological risk assessment. *Epidemiol Infect.* 2007;135:519-27. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268806007059>
97. **Mussa T, Ballester M, Silva-Campa S, Baratelli M, Busquets N, Lecours M, et al.** Swine, human or avian influenza viruses differentially activates porcine dendritic cells cytokine profile. *Vet Immunol Pathol.* 2013;154:25-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.04.004>
98. **Instituto Nacional de Salud.** Enfermedades transmisibles. Fecha de consulta: 18 de junio de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Paginas/transmisibles.aspx#.VmG27HYvfiU>
99. **Abravanel F, Lhomme S, Dubois M, Peron J, Alric L, Kamar N, et al.** General review hepatitis E virus. *Médecine et Maladies Infectieuses.* 2013;43:263-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2013.03.005>
100. **World Health Organization.** Future trends in veterinary public health. Geneva: WHO; 2002.
101. **Cripps. P.** Veterinary education, zoonoses and public health: A personal perspective. *Acta Trop.* 2000;76:77-80. [http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X\(00\)00094-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X(00)00094-2)
102. **Cediel N, Villamil L, Romero J, Rentería L, Meneghi D.** Setting priorities for surveillance, prevention, and control of zoonoses in Bogotá, Colombia. *Rev Panam Salud Pública.* 2013;33:316-24. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892013000500002>
103. **Miguel E, Boulinier T, Garine-Wichatitsky M, Carona A, Fritz H, Grosbois V.** Characterizing African tick communities at a wild-domestic interface using repeated sampling protocols and models. *Acta Trop.* 2014;138:5-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.05.019>
104. **Mackenzie J, Jeggo M, Daszak P, Richt J.** One health: The human-animal-environment interfaces in emerging infectious diseases. The concept and examples of a one health approach. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013. p. 365:X-362. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-36889-9>
105. **Makita K, Fèvre E, Waiswa C, Kaboyo W, Eisler M, Welburn S.** Evidence-based identification of the most important livestock related zoonotic diseases in Kampala, Uganda. *J Vet Med Sci.* 2011;73:991-1000. <http://dx.doi.org/10.1010.1292/jvms.11-0049>
106. **NG V, Sargeant JM.** A quantitative approach to the prioritization of zoonotic diseases in North America: A health professionals' perspective. *PloS One.* 2013;8: e72172. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072172>
107. **Instituto Colombiano Agropecuario.** Programa de erradicación de peste porcina clásica. Fecha de consulta: 17 de junio de 2015. Disponible en: [http://www.ica.gov.co/getdoc/ea9c6aa0-a5fc-472f-869b-975b27d7ac35/Peste-Porcina-Clasica-\(1\).aspx](http://www.ica.gov.co/getdoc/ea9c6aa0-a5fc-472f-869b-975b27d7ac35/Peste-Porcina-Clasica-(1).aspx)

ARTÍCULO ORIGINAL

Infección simultánea por el virus de la hepatitis E y de otras hepatitis virales en Colombia y su caracterización genotípica

Dioselina Peláez¹, Daniel Martínez-Vargas², Martha Escalante-Mora¹,
Mariel Palacios-Vivero¹, Lady Contreras-Gómez¹

¹ Grupo de Virología, Dirección de Redes en Salud Pública, Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

² Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Institución en donde se realizó el estudio: Laboratorio de Polio/EV/entéricos, Grupo de Virología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El virus de la hepatitis E se ha convertido en un problema de salud pública, especialmente en los países en desarrollo. Se conocen cuatro genotipos en mamíferos, de los cuales el G3 se ha encontrado en hepatitis autóctonas en países y regiones con gran población de cerdos, y el G1 se ha asociado a muertes maternas.

Objetivo. Determinar la infección simultánea con el virus de la hepatitis E y sus genotipos circulantes en Colombia en 1.097 sueros utilizando los marcadores serológicos de los virus de las hepatitis A, B y C.

Materiales y métodos. Se seleccionaron 1.097 sueros provenientes de diferentes municipios de Colombia, conservados en el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud. Se determinaron los anticuerpos IgG e IgM anti-hepatitis E. A los positivos se les amplificó el genoma viral mediante reacción en cadena de la polimerasa convencional. Los productos se secuenciaron y analizaron filogenéticamente y se los comparó con las secuencias del *ORF2* registradas en el GenBank.

Resultados. Se identificaron 278 sueros positivos para IgG anti-hepatitis E, 62 para IgM y 64 para ambos marcadores. La infección simultánea con los virus de la hepatitis E y la hepatitis A determinada por IgG anti-hepatitis E fue de 33,6 % y por IgM anti-hepatitis E fue de 16,1 %; la infección simultánea por los virus de la hepatitis E y B fue de 23,4 % y 8,1 %, y por los virus de la hepatitis E y C fue de 35,4 % y 5,83 %, respectivamente. De las 52 muestras positivas en la reacción en cadena de la polimerasa convencional, nueve secuencias se agruparon como genotipo 3a de origen porcino, cepa norteamericana.

Conclusiones. La mayor seropositividad se registró para las hepatitis A y E. La frecuencia de la infección simultánea con el virus de la hepatitis E y otros virus hepatótrofos indica que este patógeno puede ser más frecuente de lo esperado. La circulación del genotipo 3a implica que esta enfermedad puede presentarse en forma de brote y de zoonosis en Colombia.

Palabras clave: virus de la hepatitis E, hepatitis A, genotipo, coinfección.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2957>

Coinfection of hepatitis E virus and other hepatitis virus in Colombia and its genotypic characterization

Introduction: Hepatitis E virus has emerged as a public health problem, particularly in developing countries. The four genotypes identified in mammals include the G3 found in indigenous hepatitis in countries and regions with high porcine population, and the G1, associated with maternal deaths.

Objective: To determine coinfection by hepatitis E virus and the circulating genotypes in Colombia in 1,097 samples using serological markers for hepatitis A, B and C.

Materials and methods: Serum samples of 1,097 patients from different regions of Colombia stored at the *Laboratorio de Virología* of the *Instituto Nacional de Salud* were selected to detect IgG and IgM anti-hepatitis E virus antibodies. The viral genomes of positive samples were amplified by RT-PCR, and the products were sequenced and phylogenetically analyzed by comparing *ORF2* sequences deposited in the GenBank.

Contribución de los autores:

Dioselina Peláez: diseño del estudio, análisis e interpretación de los datos, discusión de los resultados

Lady Contreras-Gómez: diseño del estudio

Daniel Martínez-Vargas: ensayos moleculares, análisis filogenético, análisis e interpretación de los datos, discusión de los resultados y redacción del manuscrito

Mariel Palacios-Vivero y Martha Escalante-Mora: ensayos serológicos

Results: IgG anti-hepatitis E virus antibodies were found in 278 samples, IgM in 62, and both markers in 64. Hepatitis E virus and hepatitis A virus coinfection determined by IgG anti-hepatitis E virus was 33.6% and 16.1% by IgM; hepatitis E virus and hepatitis B virus coinfection was 23.4% and 8.1%, and hepatitis E virus and hepatitis C virus coinfection was 35.4% and 5.83%, respectively. Among the 52 positive samples by PCR nine were sequenced and grouped within genotype 3A of the American porcine strain.

Conclusions: The highest seropositivity was observed for hepatitis A and E. The incidence of hepatitis E virus coinfection with other hepatotropic viruses indicated that this pathogen is more frequent than expected. The circulation of genotype 3A implies that this disease may occur in outbreaks and as zoonosis in Colombia.

Key words: Hepatitis E virus, hepatitis A, genotype, coinfection.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2957>

El virus de la hepatitis E (HEV) es el agente causal de la hepatitis E, enfermedad que se transmite por vía entérica en muchas regiones del mundo y es responsable de más de 50 % de los casos de hepatitis aguda en los países endémicos (1). El virus se contagia principalmente por la vía fecal-oral y se asocia con infecciones esporádicas en los países en desarrollo, en tanto que en los países industrializados la transmisión es principalmente zoonótica, por su presencia en cerdos; los brotes epidémicos ocurren en áreas con infraestructuras sanitarias deficientes y se asocian con el consumo de agua contaminada (2). La infección durante el embarazo merece especial cuidado, ya que provoca cuadros de hepatitis fulminante con hasta 20 % de letalidad (3).

El VHE pertenece a la familia Hepeviridae, subfamilia Hepevirus, y es el único miembro del género *Orthohepevirus*; la especie tipo es *Orthohepevirus A*, comúnmente conocido como virus de la hepatitis E (4). El virus posee un genoma de ARN de cadena simple y de sentido positivo, su tamaño es de 7,2 kb y cuenta con tres marcos abiertos de lectura (5,6). Se han reportado cuatro genotipos del HEV en mamíferos: los genotipos 1 y 2, exclusivos de los seres humanos, de los cuales el genotipo 1 es la principal causa de hepatitis E esporádica y epidémica en las regiones en desarrollo de Asia y África. En Suramérica se han reportado casos aislados en Venezuela, Uruguay y Argentina (7). El genotipo 2 se ha identificado en pacientes en México, Chad y Nigeria (6,8,9). El genotipo 3 se

ha encontrado en casos de hepatitis autóctona en muchas regiones desarrolladas y tiene una alta prevalencia en poblaciones de cerdos en todo el mundo (10). El genotipo 4 se ha identificado en poblaciones humanas y de cerdos en regiones industrializadas de Japón, China, Taiwán e India (11), así como en Europa central (12-14). Aunque se han establecido varios subtipos dentro de estos cuatro genotipos, en algunos análisis recientes se sugiere que no es posible establecer límites concretos para distinguirlos de forma sistemática (15,16), sin embargo, tales categorías pueden llegar a ser útiles en los estudios epidemiológicos (17).

La infección con múltiples virus hepatótrofos y en varias combinaciones se presenta en 7 a 24 % de los casos de hepatitis viral aguda esporádica (18). Un estudio en India reportó que la infección simultánea por el HEV y el virus de la hepatitis B (HBV) detectada mediante ELISA llegó a ser de 18 %, y, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, de 6,25 %, lo cual indica que puede ocurrir en varias enfermedades hepáticas (19). La tasa de infección por el HEV y el virus de la hepatitis A (HAV) puede llegar a ser de 11,5 %, lo cual hace necesaria la detección del HEV para la planeación de estrategias de vacunación y para mejorar los programas sanitarios (20).

En Colombia hay poca información sobre la presencia del HEV (21,22) (Rendón J, Navas M, Hoyos M, Cortés F, Correa G, Sepúlveda M, et al. Evidencia serológica y molecular de la circulación del virus de la hepatitis E en Medellín. Infectio. 2010;14(Supl.1):34. Memorias, VII Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas). Por esta razón, el objetivo de este estudio fue detectar serológica y molecularmente la infección simultánea por el HEV y otros virus hepatótrofos (HAV, HBV, HCV), en sueros con diagnóstico positivo para HAV mediante la detección de IgM (+), para HBV mediante la detección

Correspondencia:

Dioselina Peláez, Grupo de Virología, Dirección de Redes en Salud Pública, Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, CAN, Bogotá, D.C., Colombia

Telefax: 220 0770, extensión 1439

dpelaez@ins.gov.co

Recibido: 03/07/15; aceptado: 03/12/15

del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg +), y para el HCV mediante ensayo de inmunotransferencia recombinante (*recombinant immunoblot assay*, RIBA +), y caracterizar el genotipo del HEV que circula en Colombia.

Materiales y métodos

Tipo de estudio

Se hizo un estudio descriptivo y retrospectivo en sueros de pacientes con diagnóstico positivo para hepatitis virales.

Selección de las muestras

Se seleccionaron muestras a conveniencia con marcadores serológicos que demostraban una infección activa para hepatitis virales: IgM anti-HAV (hepatitis A), HBsAg (hepatitis B) y RIBA para HCV (hepatitis C). Estos sueros provenientes de los 32 departamentos de Colombia, se recolectaron durante el periodo 2004-2014 y se conservaron a -25 °C en el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud. Se excluyeron los sueros lipémicos o con hemólisis, así como las muestras con una cantidad insuficiente de suero.

Pruebas serológicas

Con base en los criterios de inclusión, se analizaron 1.097 muestras de suero para la detección de anticuerpos IgG e IgM anti-HEV mediante ELISA de tercera generación, usando kits comerciales (Dia.Pro, Diagnostic Bioprobes Srl, Milán, Italia) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Extracción del ARN viral

El ARN viral de los sueros positivos para alguno de los marcadores serológicos anti-HEV se extrajo usando el QIAamp Viral RNA Mini Kit® (Qiagen, Brazil) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN aislado se almacenó a -30 °C hasta su uso posterior.

Transcripción inversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa anidada

El ARN del HEV se detectó mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada (nRT-PCR), usando dos sets de iniciadores que amplificaban fragmentos de las regiones de los genes *ORF1* y *ORF2* (23), y un set que amplificaba una región del *ORF1* (24).

Los iniciadores para el *ORF1* (23), que flanquean las posiciones 56-79 y 473-451 del genoma, corresponden a la región que codifica para la metiltransferasa (MeT) y amplifican un fragmento

de 418 pb. Los iniciadores externos (ConsORF1-s1: 5'-CTGGCATYACTACTGCTATTGAGC-3' y ConsORF1-a1: 5'-CCATCRARRCAGTAAGTGCG GTC-3') y los internos (ConsORF1-s2: 5'-CTGC CYTKGCGAATGCTGTGG-3' y ConsORF1-a2: 5'-GGCAGWRTACCARCGCTGAACATC-3') amplifican un fragmento de 287 pb.

Los iniciadores para el *ORF1* (24) amplificaron la región 4254-4560 del genoma viral, correspondiente a la región de la polimerasa (RdRp) de una longitud de 307 pb: ESP 4213-4235 5'-CATGGTAAAGTGGGTCAGGGTAT-3'. ISP 4232-4253 5'-GTATTTTCGGCCTGGAGTAAGAC-3'. IAP 4561-4583 5'-TCACCGGAGTGYTTCTTCCAGAA -3'. EAP 4576-4595 5'-AGGGTGCCGGGCTCG CCGGA-3'.

Los iniciadores para el *ORF2* corresponden a la posición 6298-6321 y 6494-6470 del prototipo Burma (código de acceso M73218 en el Gen Bank). Los iniciadores externos (ConsORF2-s1: 5'-GACAGAATTRATTTTCGTCGGCTGG-3' y ConsORF2-a1: 5'-CTTGTTTCRTGYTGGTTRTCAT AATC-3') amplificaron un producto de 197 pb en la primera PCR, y los internos (ConsORF2-s2: 5'-GTYGTCTCRGCCAATGGCGAGC-3' y ConsORF2-a2: 5'-GTTTCRTGYTGGTTRTCATAA TCCTG-3') amplificaron un producto de 145 pb en la segunda PCR.

En la primera ronda de PCR se utilizó Qiagen OneStep RT-PCR Kit® (Qiagen, Brazil), con un volumen final de reacción de 25 µl: 5 µl de solución tampón 5X RT-PCR, 1 µl de dNTP en concentración de 10 mM, 1 µl de cada iniciador en concentración de 10 µM, 1 µl de la mezcla de enzimas y 3 µl de ARN. En la segunda PCR se obtuvo un volumen final de 25 µl con los siguientes reactivos: 2,5 µl de solución tampón 10X PCR (Invitrogen); 0,5 µl de dNTP en concentración de 10 mM (Invitrogen); una unidad de Platinum Taq polymerase (Invitrogen); 1 µl de cada iniciador en concentración de 10 µM; 0,75 µl de MgCl₂ en concentración de 50 mM (Invitrogen) y 2 µl del producto amplificado de la primera PCR.

Las condiciones para la primera PCR fueron las siguientes: un ciclo de transcripción inversa a 50 °C durante 30 minutos seguido por un paso de inactivación/activación a 95 °C durante 15 minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, de anillamiento a 50 °C durante 30 segundos, de extensión a 72 °C durante 30 segundos, y una extensión final a 72 °C durante 6 minutos. La segunda PCR tuvo las siguientes

condiciones: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, de anillamiento a 50 °C durante 30 segundos, de extensión a 72 °C durante 30 segundos, y una extensión final a 72 °C durante 6 minutos.

Los productos se marcaron con SYBR Safe® (Invitrogen), se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % y se visualizaron en un fotodocumentador (Bio-Rad, Gel Doc™ XR+ System).

Secuenciación y análisis filogenético

Los productos positivos de PCR para el ARN del VHE se purificaron mediante el QIAquick PCR Purification Kit® (Qiagen, Brazil), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se secuenciaron usando el BigDye Terminator®, v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA), según las instrucciones del fabricante en un secuenciador ABI 3130 (Applied Biosystem).

Cada electroferograma se analizó y se editó usando el programa BioEdit (v. 7.2.5) para obtener la secuencia consenso a partir de las secuencias hacia adelante y hacia atrás. De la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se seleccionaron 63 secuencias de 141 pb correspondientes a la región ORF2 de VHE de distintos genotipos y diferentes partes del mundo (cuadro 1), y se alinearon con las secuencias obtenidas utilizando el programa Clustal Omega disponible en la página web del *European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). En ninguno de los países de Suramérica se encontraron secuencias del HEV G3 de la región ORF2 amplificada con los iniciadores utilizados en este estudio.

El análisis filogenético se hizo mediante el método estadístico *neighbor-joining* en el programa MEGA6 (v. 6.06), utilizando un modelo de distancias-p. Se hizo un análisis filogenético bayesiano adicional usando el programa MrBayes (v. 3.2.5) y muestreando a lo largo de todo el espacio general de tiempo reversible (*General Time Reversible*, GTR) en un total de diez millones de generaciones.

Resultados

De los 1.097 sueros procesados, 278 fueron positivos para IgG anti-HEV, 62 para IgM anti-HEV y 64 para ambos marcadores. Considerando que 342 sueros fueron positivos para IgG anti-HEV y 126 para IgM anti-HEV, la seropositividad general para IgG anti-HEV fue de 31,2 % y 11,5 % para los

Cuadro 1. Secuencias de la región ORF2 del VHE utilizadas para la construcción de los árboles filogenéticos

Número de acceso	País	Fecha de presentación
AB073912	Japón	2001
AB074915	Japón	2001
AB074917	Japón	2001
AB074918	Japón	2001
AB074920	Japón	2001
AB080575	Japón	2002
AB089824	Japón	2002
AB091394	Japón	2002
AB091395	Japón	2002
AB097811	Japón	2002
AB097812	Japón	2002
AB099347	Japón	2003
AB108537	China	2003
AB161717	Japón	2004
AB189070	Japón	2004
AB189071	Japón	2004
AB189072	Japón	2004
AB193176	Japón	2004
AB193178	Japón	2004
AB197673	China	2004
AB197674	China	2004
AB220971	Japón	2005
AB220972	Japón	2005
AB220974	Japón	2005
AB220976	Japón	2005
AB222182	Japón	2005
AB222183	Japón	2005
AB222184	Japón	2005
AB236320	Japón	2005
AB246676	Japón	2006
AB248520	Japón	2006
AB248521	Japón	2006
AB248522	Japón	2006
AB253420	Japón	2006
AF051830	Nepal	1998
AF060668	Estados Unidos	1998
AF060669	Estados Unidos	1998
AF076239	India	2001
AF082843	Estados Unidos	1998
AF185822	Paquistán	1999
AF444003	Estados Unidos	2001
AF455784	Kirguistán	2004
AF459438	India	2001
AJ272108	China	2000
AP003430	Japón	2001
AY115488	Canadá	2002
AY204877	Chad	2003
AY230202	Marruecos	2003
AY575857	Estados Unidos	2004
AY594199	China	2004
AY723745	India	2004
D10330	Japón	1992
D11092	Japón	1992
D11093	Japón	1992
DQ279091	China	2007
DQ450072	China	2006
L08816	China	1993
L25547	China	2005
M73218	Estados Unidos	1991
M74506	México	1992
M80581	Paquistán	1992
X98292	India	1996
X99441	India	1996

anticuerpos IgM anti-HEV. La infección por HEV y HAV determinada por IgG anti-HEV, fue de 33,6 % y de 16,1 % por IgM anti-HEV; para el HBV fue de 23,4 % y 8,1 % y para el HCV, de 35,4 % y 5,8 %, respectivamente (cuadro 2).

El análisis de la variable de edad mostró que 48 % de la infección simultánea por HAV y HEV, determinada por la presencia de IgM anti-HAV e IgM anti-HEV, se produjo antes de los 16 años de edad, 9 % entre los 16 y los 30 años de edad, y 41 % de los casos no registraba información sobre la edad. La infección simultánea por HBV y HEV, determinada por la presencia del HBsAg y de IgM anti-HEV, mostró que 28 % de los casos se produjo en el grupo de 2 a 15 años de edad, 32 % de 16 a 30 años, 8 % de 46 a 70 años y en 32 % de los casos no había información con respecto a la edad. Los departamentos con mayor presencia de anticuerpos anti-IgG e IgM anti-HEV fueron Putumayo, Guaviare, Boyacá y Cundinamarca (figuras 1 y 2).

De las 119 muestras positivas para IgG anti-HEV, las tres para IgM anti-HEV y las 59 para ambos marcadores, analizadas mediante PCR convencional para la detección del ARN viral, 52 fueron positivas y, de estas, nueve se secuenciaron y se encontró que correspondían al genotipo 3a de cepas norteamericanas de origen porcino (figuras 3 y 4). Estos nueve virus caracterizados se detectaron en sueros de pacientes procedentes de los departamentos de Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Putumayo y Vichada, recolectados en los años 2006, 2007 y 2009.

Discusión

En estudios previos ya se había detectado la circulación del HEV en el departamento de Antioquia (Rendón J, Navas M, Hoyos M, Cortés F, Correa G, Sepúlveda M, *et al.* Evidencia serológica y molecular de la circulación del virus de la hepatitis E en Medellín. Infectio. 2010;14(Supl.1):34. Memorias, VII Encuentro Nacional de Investigación

Cuadro 2. Resultados de las pruebas ELISA para la determinación de anticuerpos IgG e IgM anti-HEV en sueros positivos para la presencia de marcadores serológicos de HAV, HBV y HCV

Marcador serológico positivo para VHE					
IgG anti-HEV (%)		IgM anti-HEV (%)		IgG e IgM anti-HEV (%)	
VHA (n=533)	137 (25,7)	VHA (n=533)	44 (8,2)	VHA (n=533)	42 (7,9)
VHB (n=307)	62 (20,2)	VHB (n=307)	15 (4,9)	VHB (n=307)	10 (3,2)
VHC (n=257)	79 (30,7)	VHC (n=257)	3 (1,2)	VHC (n=257)	12 (4,7)
Total (n=1097)	278 (25,3)	Total (n=1097)	62 (5,6)	Total (n=1097)	64 (5,8)

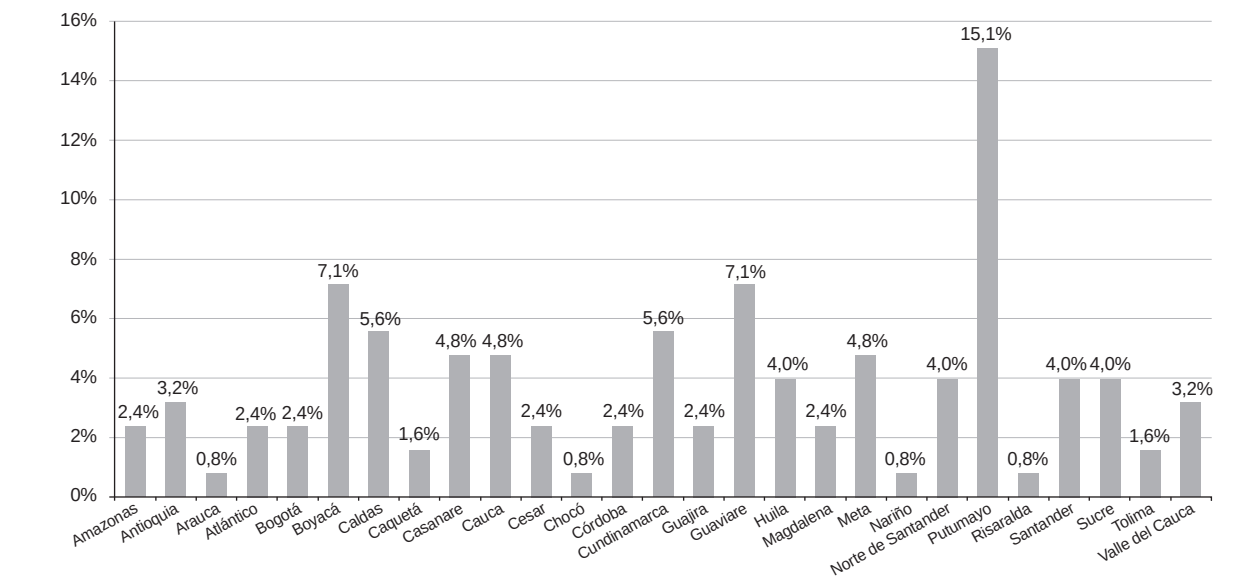


Figura 1. Porcentaje de seroprevalencia de IgM anti-VHE por departamento y según el número de muestras procesadas mediante ELISA

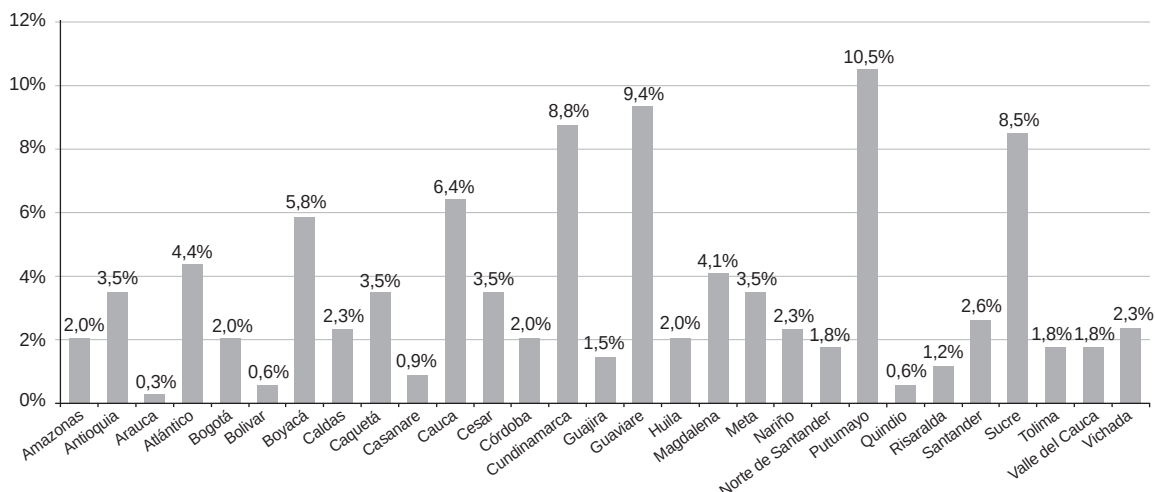


Figura 2. Porcentaje de seroprevalencia de IgG anti-VHE por departamento y según el número de muestras procesadas mediante ELISA

en Enfermedades Infecciosas) y en otros departamentos de Colombia (22); sin embargo, no existían estudios sobre la infección concomitante del HEV y otros virus hepatótrofos en el país. En este estudio se logró detectar la infección simultánea por el HEV y los virus hepatótrofos HAV, HBV y HCV mediante la detección de IgM anti-HEV, así como la infección concomitante con dichos virus determinada por la presencia de IgG anti-HEV. Los resultados muestran que uno de los mayores porcentajes de infección concomitante se registró entre el HEV y el HAV, lo cual se explica por la similitud de las características epidemiológicas de ambos virus. Los resultados obtenidos respaldan la hipótesis de un posible origen común de la transmisión por aguas o alimentos contaminados (25).

Resultó sorpresivo el alto porcentaje de infección concomitante por el HEV y los virus HBV (23,5 %) y HCV (35,4 %) (cuadro 1), teniendo en cuenta que las principales vías de transmisión de estos virus son diferentes: entérica para el HEV, contacto con sangre o fluidos corporales para el HBV y parenteral para el HCV. Sin embargo, algunos estudios en India han reportado que la infección simultánea con múltiples virus hepatótrofos se presentaba en varias combinaciones en 7 a 24 % de los pacientes con una hepatitis viral aguda (26); en Egipto este porcentaje fue de 52 % (27) y en Italia fue de 27 % (28). A partir de estos resultados pueden plantearse varias hipótesis: la infección por el HEV puede ocurrir en un paciente en recuperación de una infección previa por el HBV; también puede activar una infección crónica por el HBV previa; de igual manera, una infección previa con el HEV puede

favorecer una nueva infección con el HCV, o puede darse una transmisión simultánea de ambos virus por transfusión sanguínea. La transmisión del HEV por transfusiones sanguíneas se ha documentado en varios continentes (29-34), por lo que es posible una transmisión parenteral simultánea de HBV y HEV, y de HCV y HEV, lo cual sugiere la transmisión de estos virus por vías similares o coincidentes.

Hasta el momento no se han recabado datos sobre la seroprevalencia del HEV en la población general en Colombia, y solo se ha estimado en poblaciones con características muy definidas, de tal manera que se cuenta con una serie de reportes con datos de seropositividad que varían entre 7,5 y 11,25 % para IgG anti-HEV y entre 1,74 y 46 % para IgM anti-HEV (21,22) (Rendón J, Navas M, Hoyos M, Cortés F, Correa G, Sepúlveda M, *et al.* Evidencia serológica y molecular de la circulación del virus de la hepatitis E en Medellín. *Infectio.* 2010;14(Supl.1):34. Memorias, VII Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas). Los resultados de este estudio evidenciaron una seropositividad de 31,2 % para IgG anti-HEV y de 11,5 % para IgM anti-HEV, lo cual indica que la exposición al HEV es alta en la población de estudio y que la infección subclínica por el HEV en Colombia puede llegar a ser más común de lo que se suponía con base en los estudios previos. Con el porcentaje detectado de hepatitis E aguda se puede afirmar que esta enfermedad no se reconoce en nuestro país, probablemente porque no se la contempla en el diagnóstico de pacientes con hepatitis no-A, no-B y no-C.

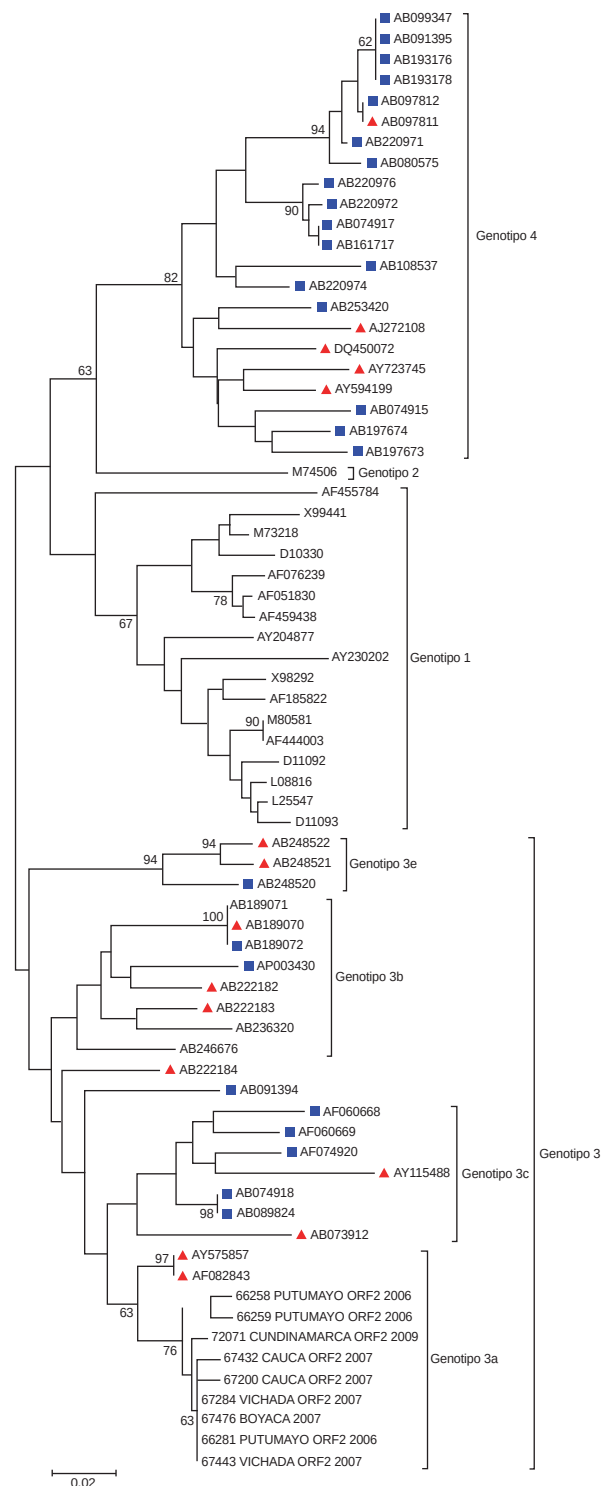


Figura 3. Análisis filogenético de las secuencias del VHE obtenidas en el estudio. Se muestran los números de acceso en el GenBank, las cepas de origen porcino (triángulos) y las de origen humano (cuadrados). Las cepas colombianas se indican con el número de muestras del laboratorio, el departamento de origen y el año de recolección. Se empleó el método de *neighbor-joining* basado en la región ORF2; los nodos muestran el análisis de *bootstrap* de 1.000 réplicas.

Según el rango de edad, 48 % de la infección simultánea con HAV y HEV se produjo en el grupo de personas de menos de 16 años de edad y, 9 %, en el grupo de 16 a 30 años de edad; la gran mayoría de estas infecciones se detectó en regiones con mala calidad del agua y prácticas de higiene deficientes, lo cual las convierte en un riesgo potencial de infección a una edad temprana. Se registró que 28 % de los casos de infección simultánea con HBV y HEV se produjo en el grupo de 2 a 15 años de edad, 32 %, en el de 16 a 30 años, y 8 %, en el de 46 a 70 años. La hepatitis B afecta a la población general, sin embargo, es más frecuente en los jóvenes, adultos y grupos poblacionales con factores de riesgo para la enfermedad; según los estudios más recientes, en Colombia se han encontrado prevalencias de HBsAg de 5,66 % (35), lo que concuerda con los grupos de edad que presentan mayor porcentaje de infección simultánea con HBV y HEV en este estudio, y evidencia que, dado que dicha endemia es de moderada a alta, es muy probable que una persona que presente el HBV se pueda infectar también con el HEV (27,36).

La caracterización genotípica del HEV es de gran importancia, ya que la gravedad de la hepatitis E está relacionada directamente con el genotipo del virus (15): las hepatitis fulminantes en mujeres embarazadas y las manifestaciones no hepáticas de la enfermedad, como la pancreatitis, están asociadas con el genotipo 1; la hepatitis crónica en pacientes con inmunodeficiencia se ha observado principalmente en infecciones con el genotipo 3 del HEV (37). Además, todos los casos de transfusión relacionados con la hepatitis E han sido causados por cepas del HEV de los genotipos 3 y 4, lo cual sugiere un potencial de transmisión parenteral de estos genotipos zoonóticos (38).

Por otra parte, en estudios en Colombia se ha demostrado la presencia del genotipo 3 del virus en el agua de consumo humano (Baéz P, Jaramillo CM, Arismendi L, Rendón JC, Cortés-Mancera F, Toro M, *et al.* Evidencia molecular de virus de la hepatitis E en fuentes de agua en Antioquia. Biomédica. 2015;35(Supl.1):40-1. Memorias, VI Simposio Colombiano de Virología), lo que restaría argumentos para pensar en una posible infección simultánea por el HEV y los virus HBV y HCV por vía parenteral. Sin embargo, es necesario adelantar nuevas investigaciones en el país sobre otras vías de transmisión del HEV diferentes de la entérica, ya que los datos obtenidos en este estudio

En conclusión, se logró determinar la infección concomitante del VHE y otros virus hepatotrópicos (HAV, HBV y HCV), con porcentajes de infección dual de HBV y HEV, y HCV y HEV sorpresivamente altos si se tiene en cuenta que las principales vías de transmisión de estos virus son muy diferentes (entérica y parenteral). Esto abre la posibilidad de considerar la vía parenteral como una vía de transmisión secundaria del HEV en el país. Los casos de infección simultánea con HAV y HEV pueden llegar a ser más comunes debido a que ambos virus comparten la vía de transmisión entérica, y por las deficiencias en el tratamiento del agua para consumo humano en algunos departamentos del país, donde se ha detectado la presencia de ambos virus en el agua para consumo humano.

Los departamentos con mayor presencia de anticuerpos IgG e IgM anti-HEV fueron Putumayo, Guaviare, Boyacá y Cundinamarca (figuras 1 y 2). Estas regiones se han caracterizado históricamente por su deficiente suministro de agua potable (41,42), lo cual explicaría la gran seroprevalencia no solo para anticuerpos anti-HEV, sino también, las altas tasas de hepatitis A (43). Tradicionalmente, estos también son departamentos con una gran población porcina (<http://www.dane.gov.co/index.php/agropecuario-alias/estadisticas-de-sacrificio-de-ganado-esag>), lo cual estaría favoreciendo el ciclo zoonótico de la enfermedad.

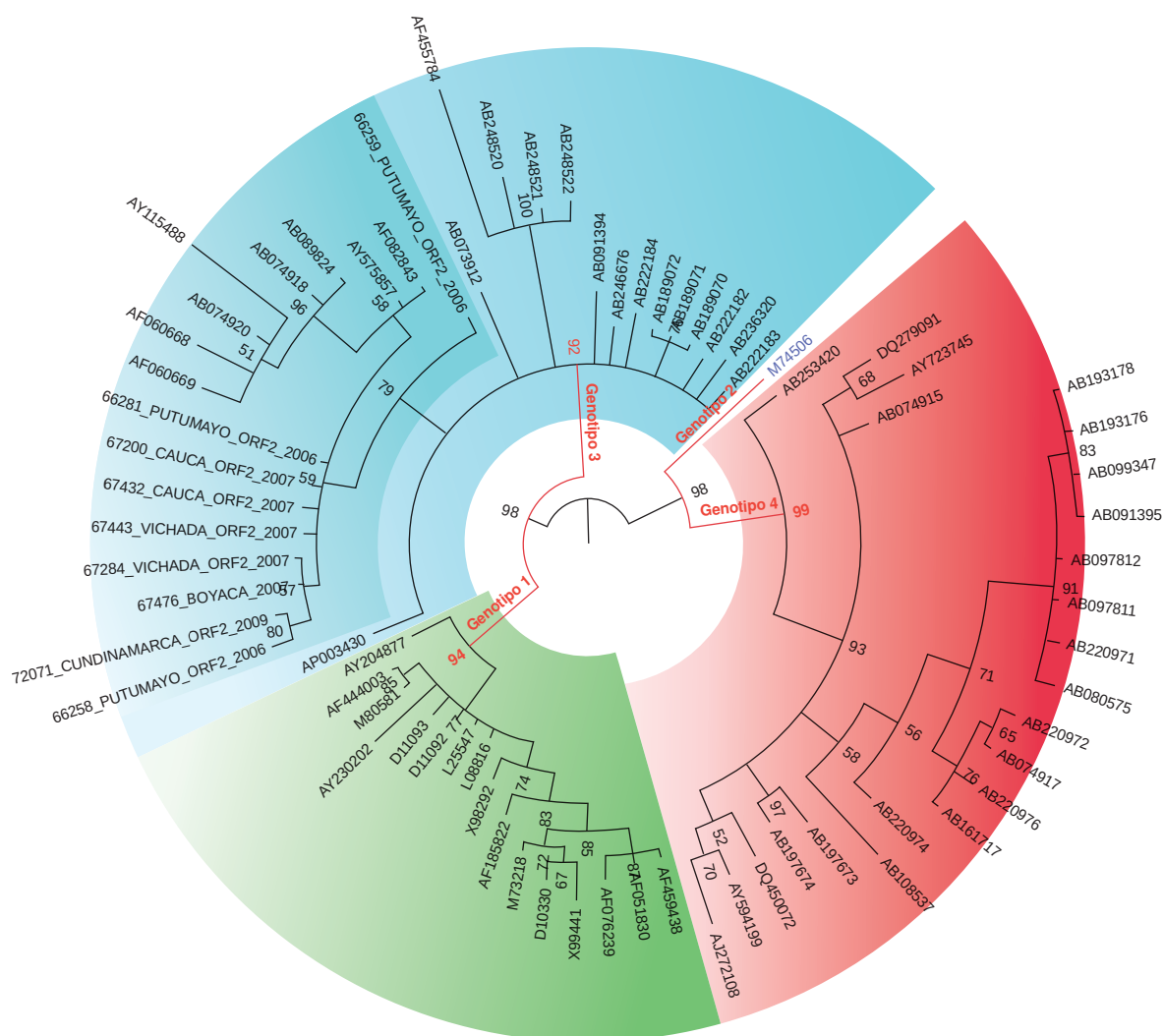


Figura 4. Árbol filogenético construido mediante inferencia bayesiana basado en la región ORF2. Se muestran los números de acceso en el GenBank de las diferentes cepas del VHE. Los números en los nodos indican la probabilidad posterior de cada clado. Las cepas colombianas se indican con el número de muestras del laboratorio, el departamento de origen y el año de recolección.

La detección del genotipo 3 del HEV en varios departamentos del país, sumada a los hallazgos de otros estudios realizados en Colombia, confirma que este es el genotipo que está circulando, lo que concuerda con el predominante en Suramérica. La identificación del subtipo 3a abre la puerta para futuras investigaciones sobre las posibles implicaciones epidemiológicas asociadas a dicho subtipo en el país. Una vez establecida la circulación del HEV en Colombia, se hace necesario profundizar en el estudio del virus para establecer su incidencia en la población, las vías de transmisión y los efectos de la infección dual con otros virus causantes de hepatitis, con el fin de crear estrategias de control y prevención de la infección.

Agradecimientos

A la unidad de secuenciación de genomas del Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud y a todas las personas que de alguna manera hicieron posible este estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiación

El presente estudio fue financiado por el Instituto Nacional de Salud y por Colciencias (proyecto No. 710 de 2013, código No. 2010456935048).

Referencias

1. **Pérez-Gracia MT, Suay B, Mateos-Lindemann ML.** Hepatitis E: An emerging disease. *Infect Genet Evol.* 2014;22:40-59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.01.002>
2. **Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M.** Hepatitis E: An emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis.* 2008;8:698-709. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70255-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70255-X)
3. **Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT.** Hepatitis E and pregnancy: Understanding the pathogenesis. *Liver Int.* 2008;28:1190-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01840.x>
4. **Smith DB, Simmonds P, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng XJ, et al.** Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol.* 2014;95:2223-32. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.068429-0>
5. **Purdy MA, Khudiyakov YE.** Evolutionary history and population dynamics of hepatitis e virus. *PLoS One.* 2010;5:e14376. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0014376>
6. **Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, et al.** Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology.* 1991;185:120-31. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90760-9](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(91)90760-9)
7. **Echevarría JM, González JE, Lewis-Ximénez LL, Lopes dos Santos DR, Munne MS, Pinto MA, et al.** Hepatitis E virus infection in Latin America: A review. *J Med Virol.* 2013;85:1037-45. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.23526>
8. **Buisson Y, Grandadam M, Nicand E, Cheval P, van Cuyck-Gandre H, Innis B, et al.** Identification of a novel hepatitis E virus in Nigeria. *J Gen Virol.* 2000;81:903-9. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-81-4-903>
9. **van Cuyck-Gandre H, Zhang HY, Tsarev SA, Clements NJ, Cohen SJ, Caudill JD, et al.** Characterization of hepatitis E virus (HEV) from Algeria and Chad by partial genome sequence. *J Med Virol.* 1997;53:340-7.
10. **Engle RE, Yu C, Emerson SU, Meng XJ, Purcell RH.** Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4576-80. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.12.4576-4580.2002>
11. **Lu L, Li C, Hagedorn CH.** Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: Genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol.* 2006;16:5-36.
12. **Colson P, Brunet P, Lano G, Moal V.** Hepatitis E virus genotype 4 in Southeastern France: Still around. *Liver Int.* 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/liv.12924>
13. **Monne I, Ceglie L, Di Martino G, Natale A, Zamprogna S, Morreale A, et al.** Hepatitis E virus genotype 4 in a pig farm, Italy, 2013. *Epidemiol Infect.* 2015;143:529-33. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268814001150>
14. **Hakze-van der Honing RW, van Coillie E, Antonis AF, van der Poel WH.** First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PLoS One.* 2011;6:e22673. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022673>
15. **Okamoto H.** Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* 2007;127:216-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2007.02.002>
16. **Oliveira-Filho EF, Koenig M, Thiel H-J.** Genetic variability of HEV isolates: Inconsistencies of current classification. *Vet Microbiol.* 2013;165:148-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.026>
17. **Dai X, Dong C, Zhou Z, Liang J, Dong M, Yang Y, et al.** Hepatitis E virus genotype 4, Nanjing, China, 2001-2011. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:1528-30. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1909.130013>
18. **Poddar U, Thapa BR, Prasad A, Singh K.** Changing spectrum of sporadic acute viral hepatitis in Indian children. *J Trop Pediatr.* 2002;48:210-3. <http://dx.doi.org/10.1093/tropej/48.4.210>
19. **Singh A, Singh S, Ansari MA, Irshad M.** Co-infectivity of hepatitis B virus and hepatitis E virus. *BMC Infect Dis.* 2012;12(Supl.1):P1. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-12-S1-P1>
20. **Rao P, Shenoy MS, Baliga S, Joon A.** Prevalence of HAV and HEV in the patients presenting with acute viral hepatitis. *Indian J Med Microbiol.* 2015;33(Suppl.):102-5. <http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.150908>
21. **Betancur C, Mejía M, Portillo S.** Seroprevalencia de hepatitis E en trabajadores de fincas porcícolas del Valle de Aburrá, 2011-2012. *Acta Médica Colombiana.* 2013;38:68-70.

22. **Peláez D, Hoyos MC, Rendón JC, Mantilla C, Ospina MC, Cortés-Mancera F, *et al.*** Infección por el virus de la hepatitis E en pacientes con diagnóstico clínico de hepatitis viral en Colombia. *Biomédica*. 2014;34:354-65. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i3.2236>
23. **Wang Y, Ling R, Erker JC, Zhang H, Li H, Desai S, *et al.*** A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J Gen Virol*. 1999;80:169-77. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-80-1-169>
24. **Zhai L, Dai X, Meng J.** Hepatitis E virus genotyping based on full-length genome and partial genomic regions. *Virus Res*. 2006;120:57-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.013>
25. **Rodríguez-Lay LdeA, Quintana A, Montalvo-Villalba MC, Leimos G, Corredor MB, Moreno AG, *et al.*** Dual infection with hepatitis A and E viruses in outbreaks and in sporadic clinical cases: Cuba 1998-2003. *J Med Virol*. 2008;80:798-802. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21147>
26. **Kumar A, Yachha SK, Poddar U, Singh U, Aggarwal R.** Does co-infection with multiple viruses adversely influence the course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in children? *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21:1533-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04509.x>
27. **Zaki Mel S, Salama OS, Mansour FA, Hossein S.** Hepatitis E virus coinfection with hepatotropic viruses in Egyptian children. *J Microbiol Immunol Infect*. 2008;41:254-8.
28. **Pisanti FA, Coppola A, Galli C.** Association between hepatitis C and hepatitis E viruses in southern Italy. *Lancet*. 1994;344:746-7.
29. **Arankalle VA, Chobe LP.** Retrospective analysis of blood transfusion recipients: Evidence for post-transfusion hepatitis E. *Vox Sang*. 2000;79:72-4. <http://dx.doi.org/10.1159/000031215>
30. **Boxall E, Herborn A, Kochethu G, Pratt G, Adams D, Ijaz S, *et al.*** Transfusion-transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country. *Transfus Med*. 2006;16:79-83. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3148.2006.00652.x>
31. **Colson P, Coze C, Gallian P, Henry M, De Micco P, Tamalet C.** Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:648-9. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1304.061387>
32. **Haim-Boukobza S, Ferey MP, Vetillard AL, Jebblaoui A, Pelissier E, Pelletier G, *et al.*** Transfusion-transmitted hepatitis E in a misleading context of autoimmunity and drug-induced toxicity. *J Hepatol*. 2012;57:1374-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.08.001>
33. **Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, *et al.*** Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion*. 2004;44:934-40. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2004.03300.x>
34. **Matsubayashi K, Kang JH, Sakata H, Takahashi K, Shindo M, Kato M, *et al.*** A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion*. 2008;48:1368-75. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01722.x>
35. **Tolosa N.** Hepatitis B, C y coinfección hepatitis B-Delta. Fecha de consulta: 16 de septiembre de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/subdireccion-vigilancia/sivigila/protocolos%20sivigila/pro%20hepatitis%20b%20c%20y%20delta.pdf>
36. **Ganova-Raeva L, Punkova L, Campo DS, Dimitrova Z, Skums P, Vu NH, *et al.*** Cryptic hepatitis B and E in patients with acute hepatitis of unknown etiology. *J Infect Dis*. 2015;212:1962-9. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiv315>
37. **Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J.** Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27:116-38. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00057-13>
38. **Rodríguez-Frías F, Jardi R, Buti M.** Hepatitis E: virología molecular, epidemiología y patogénesis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;30:624-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.01.014>
39. **Pillonel J, Gallian P, Sommen C, Couturier E, Piquet Y, Djoudi R, *et al.*** Assessment of a transfusion emergent risk: The case of HEV. *Transfus Clin Biol*. 2014;21:162-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tracbi.2014.07.004>
40. **Gallian P, Piquet Y, Assal A, Djoudi R, Chiaroni J, Izopet J, *et al.*** Hepatitis E virus: Blood transfusion implications. *Transfus Clin Biol*. 2014;21:173-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tracbi.2014.07.007>
41. **Guzmán B, Nava G, Mejía A, Soler J.** Estado de la vigilancia de la calidad del agua para consumo humano en Colombia - 2013. Fecha de consulta: 16 de septiembre de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/sivicap/Normatividad/Estado%20de%20la%20vigilancia%20de%20la%20calidad%20del%20agua%202013.pdf>
42. **Contreras M, González K.** El acceso al agua para consumo humano en Colombia. Fecha de consulta: 16 de septiembre de 2015. Disponible en: <http://www.economiainstitucional.com/esp/vinculos/pdf/No29/myanez29.pdf>
43. **Folleco A.** Informe final hepatitis A, Colombia, 2013. Fecha de consulta: 16 de septiembre de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co:81/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/HEPATITIS%20A%202013.pdf>

ORIGINAL ARTICLE

Analysis of hepatitis B virus genotypes by restriction fragment length polymorphism

Julio C. Rendón¹, Fabián Cortés-Mancera^{1,2}, Alejandra Duque-Jaramillo¹,
Marta C. Ospina³, María Cristina Navas¹

¹ Grupo de Gastrohepatología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Facultad de Ciencias Exactas, Instituto Tecnológico Metropolitano, Medellín, Colombia

³ Laboratorio Departamental de Salud Pública, Secretaría Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia, Medellín, Colombia

Introduction: Ten viral genotypes (A-J) distributed in all continents have been described for hepatitis B virus (HBV). One of the methodologies for determining the viral genotype is the restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique, a simple and relatively inexpensive method, albeit with some limitations.

Objective: The initial objective of the project was to identify the HBV genotypes by RFLP in serum samples obtained from patients and blood donors. However, due to the discrepancies of RFLP patterns it was also necessary to perform phylogenetic genotyping and *in silico* analysis of HBV sequences.

Materials and methods: We obtained 56 serum samples. DNA extraction was followed by PCR amplification of a fragment of HBV ORF S. We analyzed PCR products by RFLP with *AlwI*, *BsrI*, *CfrI*, *HpaII* and *SylI*, and we sequenced some. We compared the patterns obtained with those in previous reports. We also performed RFLP analysis *in silico* since we found differences between the patterns expected and those obtained

Results: We identified genotypes A and F, subgenotype F3, in the samples. This result is in agreement with those of previous studies carried out in Colombia; indeed, subgenotype F3 is the most frequent in the Andean region of the country, while genotype A is the most frequent HBV genotype in the western region (department of Chocó). Based on the *in silico* analysis of 229 HBV sequences from GenBank and 11 sequences of this study, we identified the RFLP pattern for genotype F, subgenotype F3, and we described some modifications of genotype A RFLP patterns.

Conclusions: We identified the single nucleotide polymorphism pattern for genotype F, subgenotype F3, by *in silico* analysis and sequencing. Further robust *in silico* analyses are necessary to validate the RFLP patterns of HBV genotype and subgenotypes.

Key words: Hepatitis B virus; polymorphism, restriction fragment length; genotype.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2976>

Análisis de genotipos del virus de la hepatitis B mediante el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

Introducción. Se han descrito diez genotipos (A-J) del virus de la hepatitis B (HBV) que están distribuidos en todos los continentes. Una de las técnicas utilizadas para determinar el genotipo viral es el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, un método simple y económico, pero con algunas limitaciones.

Objetivo. El objetivo inicial del estudio fue identificar el genotipo del HBV mediante RFLP en muestras de suero obtenidas de pacientes y donantes de sangre. Sin embargo, por las discrepancias observadas en los patrones de RFLP fue necesario realizar análisis filogenéticos y un análisis *in silico* de secuencias del HBV.

Materiales y métodos. Se obtuvieron 56 muestras de suero. Tras la extracción de ADN, se amplificó un fragmento del ORF S del HBV mediante reacción en cadena de la polimerasa, cuyos productos

Author's contributions:

Julio C. Rendón: conception, design and performance of experiments, data analysis and drafting of the manuscript

Fabián Cortés-Mancera: conception and design of experiments, data analysis

Marta C. Ospina: serological markers

María Cristina Navas: conception and design of experiments, data analysis and drafting of the manuscript

Alejandra Duque-Jaramillo: data analysis and drafting of the manuscript

All authors read and approved the final manuscript.

se analizaron por RFLP con las enzimas *AlwI*, *BsrI*, *CfrI*, *HpaII* y *StyI*, y algunos se secuenciaron. Los patrones obtenidos se compararon con los reportados previamente. Se efectuó un análisis *in silico* de RFLP en consideración de las diferencias entre los patrones esperados y los observados.

Resultados. Se identificaron los genotipos A y F, subgenotipo F3, en las muestras. Este resultado coincide con lo descrito en estudios previos en los que se ha demostrado que el genotipo F, subgenotipo F3, es prevalente en la población de la región andina del país, en tanto que el genotipo A predomina en el occidente (departamento del Chocó). Con base en el análisis *in silico* de 229 secuencias virales obtenidas del GenBank y las 11 secuencias de este estudio, se caracterizó un nuevo patrón de RFLP específico para el genotipo F, subgenotipo F3, y se describieron algunas modificaciones en el patrón de RFLP del genotipo A, subgenotipo A1.

Conclusiones. Se caracterizó el patrón de genotipificación del genotipo F, subgenotipo F3, del HBV mediante RFLP, análisis *in silico* y secuenciación. Se requieren nuevos análisis *in silico* con un número mayor de secuencias para validar los patrones de RFLP de los genotipos y subgenotipos del VHB.

Palabras clave: virus de la hepatitis B, polimorfismo de longitud del fragmento de restricción, genotipo.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2976>

Hepatitis B virus (HBV) infection is a worldwide public health problem (1). Hepatitis B virus belongs to the Hepadnaviridae family, genus *Orthohepadnavirus* and has a partially double-stranded circular DNA genome of 3.2 kb, with four overlapped open reading frames (ORF): S, precore/core, polymerase and X (2-4).

Hepatitis B virus has been classified as having 10 genotypes (A-J), and subgenotypes have been reported for four of these, i.e., A-D, F and I (5-10). The geographical distribution of HBV genotypes is as follows: A (subgenotypes A1-A6) in Asia, Africa, Europe and America; B (subgenotypes B1-B9) in Asia, Oceania and Canada; C (subgenotypes C1-C16), prevalent in Asia and Oceania. Genotype D (subgenotypes D1-D9) has a global distribution, and so does genotype A; however, it circulates mostly in Europe, the Middle East, North Asia, Australia and the USA. Genotype E is found in West and Central Africa, although a few cases have also been reported in Europe (11) and Colombia (12). Genotype G is found in France, Germany, Japan, USA and Africa. The two newly identified and putative genotypes I (I1-I2) and J were described in samples obtained from patients from Laos (13) and Japan (14), respectively. Genotypes F and H are exclusive to America: Genotype F (subgenotypes F1-F4) is found throughout the Americas, from Alaska to Argentina, while genotype H is found in Central America and southern US (7-9,15-18).

Colombia is a country of low-intermediate prevalence for hepatitis B infection (19). According to the *Instituto Nacional de Salud*, 2,258 cases of hepatitis B were reported in 2014 (incidence: 4.73/100,000); however, the departments of Amazonas, Norte de Santander, Guainía, Guaviare and Chocó showed higher incidence rates of HBV infection (20).

The gold standard technique for HBV genotyping is phylogenetic analysis (21); however, this technique is expensive and time-consuming, it requires technology resources and trained personnel that are not widely available in public health laboratories. Alternative techniques that have been used for HBV genotyping include microarrays (DNA-chips) (22), restriction fragment length polymorphism (RFLP) (23), multiplex PCR (24) and hybridization with genotype-specific probes (INNO-LiPA) (25,26).

Various RFLP protocols for HBV genotyping have been described, most of them based on the amplification and restriction of ORF S sequences (23,27-29). The RFLP method is used in genotyping studies because it is a simple and relatively inexpensive method to determine the HBV genotype, particularly for large-scale analyses (30-32).

In the present study, we used RFLP to characterize HBV strains obtained from Colombian patients and blood donors. As we found inconsistencies with previously published RFLP patterns for A and F genotypes, we carried out an *in silico* RFLP analysis to clarify these results. We report here the new restriction pattern for genotype F, subgenotype F3, and some modifications of genotype A, subgenotype A1, pattern.

Corresponding author:

María Cristina Navas, Grupo de Gastrohepatología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, calle 70 N° 52-21, Medellín, Colombia

Telephone: (574) 219 6573; fax: (574) 219 6565
maria.navas@udea.edu.co

Recibido: 15/07/15; aceptado: 03/12/15

Materials and methods

Samples

We obtained 56 serum samples from patients, blood donors and asymptomatic individuals with risk factors. We included 45 samples from blood donors positive for hepatitis B surface antigen (HBsAg) and anti-HBV core antibodies (anti-HBc). The samples were sent in 2007 by four different blood banks to the *Laboratorio de Salud Pública de Antioquia* for confirmatory tests. Nine samples from patients with clinical diagnosis of viral hepatitis (HBsAg+ and anti-HBc+) were obtained during 2008 and 2009 from primary health units in Medellín. We also included two serum samples obtained in 2009 from asymptomatic patients with risk factors for HBV infection from the cities of Quibdó and Apartadó (western Colombia), positive for HBsAg by rapid test (One Step HBsAg Rapid Test Kit, Intec, China) and by ELISA (HBsAg microparticle enzyme immunoassay, Abbot, USA).

Samples were stored at -70°C prior to DNA extraction, which was done no later than six months after serum collection.

All participating patients and blood donors signed the informed consent and donation forms. The ethics committees of *Universidad de Antioquia-SIU* and the *Fundación Antioqueña de Infectología* approved the studies.

HBV DNA detection

We extracted total DNA from 175 µl of each serum sample using TRIzol Reagent (Invitrogen, USA). We amplified a fragment of the HBV ORF S (585 nt) by hemi-nested or nested polymerase chain reaction (PCR), using primers PrsS2, S1R, Ys1 and YS2 (29).

For the nested PCR, we performed both amplification rounds using two units of Taq polymerase (Fermentas, USA), 2.5 mM of MgCl₂, 5 µM of dNTP (Promega, USA) and 0.5 mM of primers S1R and PrsS2 for the first PCR, and of YS1 and YS2 for the second one. The thermal cycling conditions were as follows: An initial 3 min step at 95°C followed by 40 cycles of amplification at 94°C for 45 sec, 53°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final step at 72°C for 5 min.

Both amplification rounds of the semi-nested PCR were carried out using two units of Taq polymerase (Fermentas, USA), 2mM MgCl₂, 10 µM dNTPs (Promega, USA), and 0.5 mM primers YS1 and SR1 for the first PCR and YS1 and YS2 for the

second PCR. The thermal cycling conditions were: an initial 3 min step at 95°C, followed by 40 cycles of 94°C for 1 min, 53°C for 40 sec and 72°C for 1 min, and a last step at 72°C for 5 min. We visualized PCR products in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

Hepatitis B virus genotyping

We purified PCR products using standard Exo Sap-IT (USB, Staufen, Germany). We analyzed the nucleotide sequences of PCR products in both senses by automated dideoxy-sequencing (Macrogen Inc. Seoul, Rep. of Korea).

The sequences obtained were aligned with 118 HBV sequences for ORF S available in GenBank using the Clustal W Multiple Alignment application contained in BioEdit 7.0.5.3 (33). Phylogenetic analysis was conducted using MEGA, version 5.0 (34) applying the neighbor-joining method with genetic distances evaluated with Kimura 2 parameters corrections, maximum parsimony and maximum likelihood. We statistically evaluated the reliability of the trees by bootstrap analysis with 1,000 replicates.

PCR products digestion was done in independent reactions with each of these restriction enzymes: *AlwI*, *BsrI*, *HpaI*, *StyI* (Biolabs, USA) or *CfrI* (Fermentas, USA). Enzyme *AlwI* was used in this analysis instead of *DpnI* or *Sau3AI* enzymes used in previous studies (33). The *AlwI* restriction site is GGATC while the restriction site for *DpnI* and *Sau3AI* is GATC. However, for the definition of the new restriction patterns described in the present study we did not consider the differences between previous reports and our findings using this enzyme.

We visualized digested products in 3% agarose gels stained with ethidium bromide.

The viral genotype was determined by comparing the obtained restriction pattern with the patterns previously reported by Zeng, *et al.* (29) and Venegas, *et al.* (30).

In silico RFLP and pairwise sequence analysis

We conducted an *in silico* RFLP analysis after we found that the patterns obtained did not match those in previous reports. For this analysis, we obtained sequences of genotypes A-H from the GenBank database based on the geographical origin. We selected two hundred and twenty-nine sequences of HBV ORF S for this analysis. The selection criterion was the availability of complete

HBV genome sequences at GenBank. Furthermore, we selected sequences from studies carried out with samples from different locations or at the same location but in a different period. Where complete HBV genome sequences were not available, then those of ORF S were included in the analysis.

The region between 203 nt and 767 nt (with sequence NC003977 as reference) was aligned and analyzed to determine the expected pattern obtained after digestion with *AlwI*, *BsrI*, *CfrI*, *HpaII* and *StyI* restriction enzymes using the software BioEdit 7.0.9.0 (Ibis biosciences, Canada).

Results

HBV molecular detection and genotyping

We amplified a fragment of the HBV ORF S by PCR in 17/56 serum samples: 6/45 (13.3%) from blood donors, 9/9 from patients with clinical diagnosis of viral hepatitis, and 2/2 from asymptomatic individuals with risk factors.

The low proportion of samples from blood donors with HBV DNA amplification (13.3%) could be due to the DNA extraction method (Trizol) and its efficiency for low viral load samples.

We conducted RFLP analysis for these 17 samples. These analyses showed three different restriction patterns (figure 1, patterns 1-3); nine samples showed pattern 1, one showed pattern 2, and seven, showed pattern 3. None of them was similar to the previously reported patterns (29,30).

Patterns 1 and 2 as reported by Zeng, *et al.* and Venegas, *et al.* (29,30) were quite similar to that of genotype A (figure 2, panel 1); however, restriction with *AlwI* generated only one fragment instead of three in the study samples (figure 1).

On the other hand, pattern 3 was comparable with the expected result for genotype F (figure 2, panel 3), except for the restriction with *StyI*

enzyme resulting in two fragments in the samples rather than none, as seen in the pattern previously described.

Sequencing and phylogenetic analysis

We obtained the ORF S sequence from 11 serum samples previously analyzed by RFLP. No serum samples from blood donors remained for the phylogenetic analysis. We aligned the 11 sequences with 118 sequences of HBV selected from Gen Bank. The phylogenetic relationships of sequences were similar using different methodologies. Figure 3 shows a representative phylogenetic tree.

The phylogenetic analysis showed that 8/11 samples (72.7%) clustered with genotype A sequences, while the remaining three sequences (27.3%) clustered with genotype F (figure 3).

In silico analysis

In order to detect polymorphisms that could modify the RFLP patterns, we analyzed 229 HBV sequences available from GenBank *in silico*. Table 1 summarizes the variations in the sites recognized by the restriction enzymes used on the RFLP protocol.

The *in silico* analysis demonstrated that sequences corresponding to HBV genotype A (subgenotypes A2, A3, A4), genotype B (subgenotype B1), genotype D (subgenotypes D1, D2 and D4), and genotypes C, G and H showed identical patterns to those previously described by Zeng, *et al.* (29). On the other hand, the sequences corresponding to genotype A, subgenotype A1, previously described as pattern A3 by Zeng, *et al.*, and to genotype B (subgenotypes B2 to B4), genotype D (subgenotypes D1 to D3), genotype F (subgenotypes F1 to F4), and genotype E exhibited variations on the restriction patterns (table 1).

Two restriction sites in the sequences belonging to subgenotype A1 were found to be absent in 5/9 sequences for *AlwI* (nt 291) and in 6/9 for *BsrI* (nt 501). Moreover, we identified four additional restriction sites for subgenotype A1: *AlwI* (nt 481) in 6/9 sequences, *BsrI* (nt 757) in 4/9 sequences, *StyI* (nt 757) in 2/9 sequences and *BsrI* (nt 366) in 1/9 sequences. We found variations in subgenotypes A2, A3 and A4, but only in 1-2 of the analyzed sequences, so we did not consider them significant (table 1, marked with asterisks).

Regarding subgenotype F3, 15 of the 25 sequences exhibited an additional restriction site for *StyI* (nt 453), with two bands (334 and 251 bp) instead of

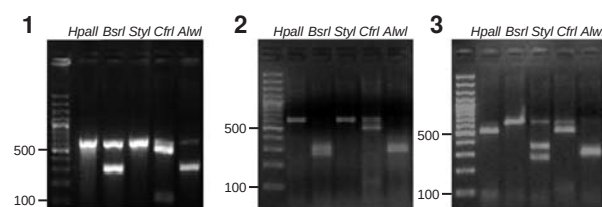


Figure 1. RFLP patterns of HBV. The PCR product of HBV S ORF digestion was done with *AlwI*, *BsrI*, *CfrI*, *HpaII* and *StyI* restriction enzymes and visualized in an agarose gel stained with ethidium bromide. All patterns are presented with a 100-bp ladder marker.

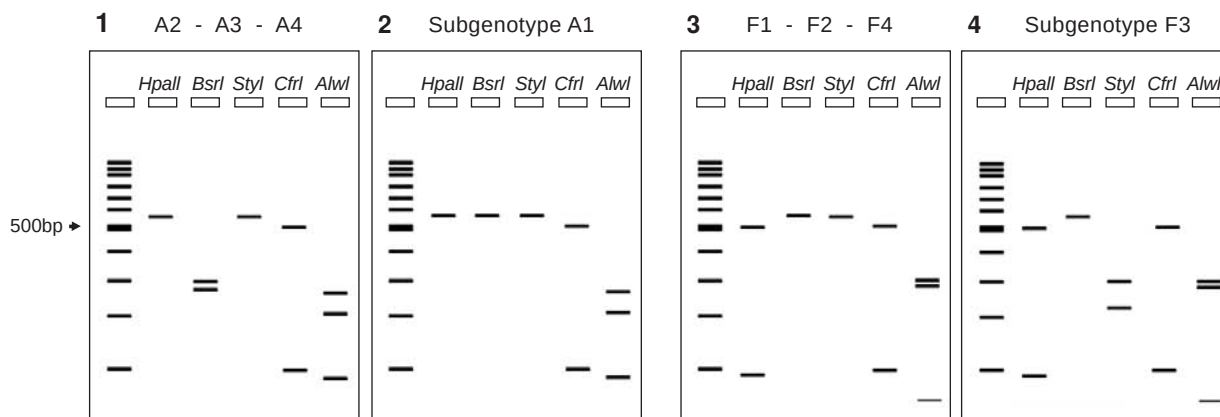


Figure 2. Schematic representation of RFLP patterns for HBV genotypes A and F. Panels 1 and 3 represent the patterns for genotypes A and F described previously, panel 2 shows the restriction pattern for subgenotype A1 and panel 4 the new pattern for subgenotype F3. All patterns are presented with a 100-bp molecular marker.

one (585 bp). This new restriction site could explain the results of the RFLP assays (figure 1, pattern 3) and would be useful in differentiating F3 from the other F subgenotypes.

Discussion

This study describes the HBV genotypes of serum samples obtained from Colombian patients and blood donors. We also report modifications of previously established RFLP patterns of HBV genotypes based on results obtained with serum samples and the *in silico* analysis of 229 HBV ORF S sequences.

We report a specific RFLP pattern for the F3 subgenotype confirmed by sequencing and *in silico* analysis. Additionally, we characterized the pattern of genotype A sequences, subgenotype A1, previously reported by Zeng, *et al.*, as pattern A3 (29) in a study conducted in 2004 where the authors described four patterns for genotype A; however, these are not strictly correlated with the subgenotypes A1, A2, A3, A4, considering the limited number of HBV sequences available before 2004. Moreover, the patterns A3 and A4 were identified using one sequence in each case (29).

RFLP is a good technique for viral genotyping because of its simplicity and low cost; however, there are some disadvantages such as the fact that it has to be done on a highly conserved sequence of 6-8 nucleotides and that mutations at the recognition site of the restriction enzymes could alter genotype characterization. It is important to take into account the genetic variability of HBV when identifying the polymorphisms that modify

RFLP patterns present at each restriction enzyme recognition site. Nevertheless, RFLP continues to be used for HBV genotyping (32,35,36).

In our study, RFLP genotyping was based on the method described by Zeng, *et al.* (29). Since then, two new genotypes (13,37), and several new subgenotypes for genotypes A-D and F (38-42) have been described. The current classification by RFLP can now be re-evaluated taking into account this new data.

In our case, we analyzed each sample with the five restriction enzymes previously described in independent reactions. This differs from the methodology used in other studies, where a flow-chart for restriction is followed for RFLP genotyping (29,30). The patterns we obtained were different to those previously reported, which led us to propose an *in silico* RFLP analysis of a large number of sequences for genotypes A to H. We identified a new specific RFLP pattern for the F3 subgenotype confirmed by sequencing and phylogenetic analysis, as well as some modifications of the subgenotype A1 pattern.

We identified eight of the ten samples analyzed by RFLP that showed restriction patterns 1 or 2 (figure 1) as genotype A by phylogenetic analysis (figure 3). On the other hand, we sequenced and identified three of seven samples showing restriction pattern 3 as genotype F. The new *Styl* restriction site at nt453 was present in these three sequences, as shown in figure 1; given that this site was found in a representative number of F3 sequences in the *in silico* analysis (15/25), but only one of the six F4 sequences and none of the ten

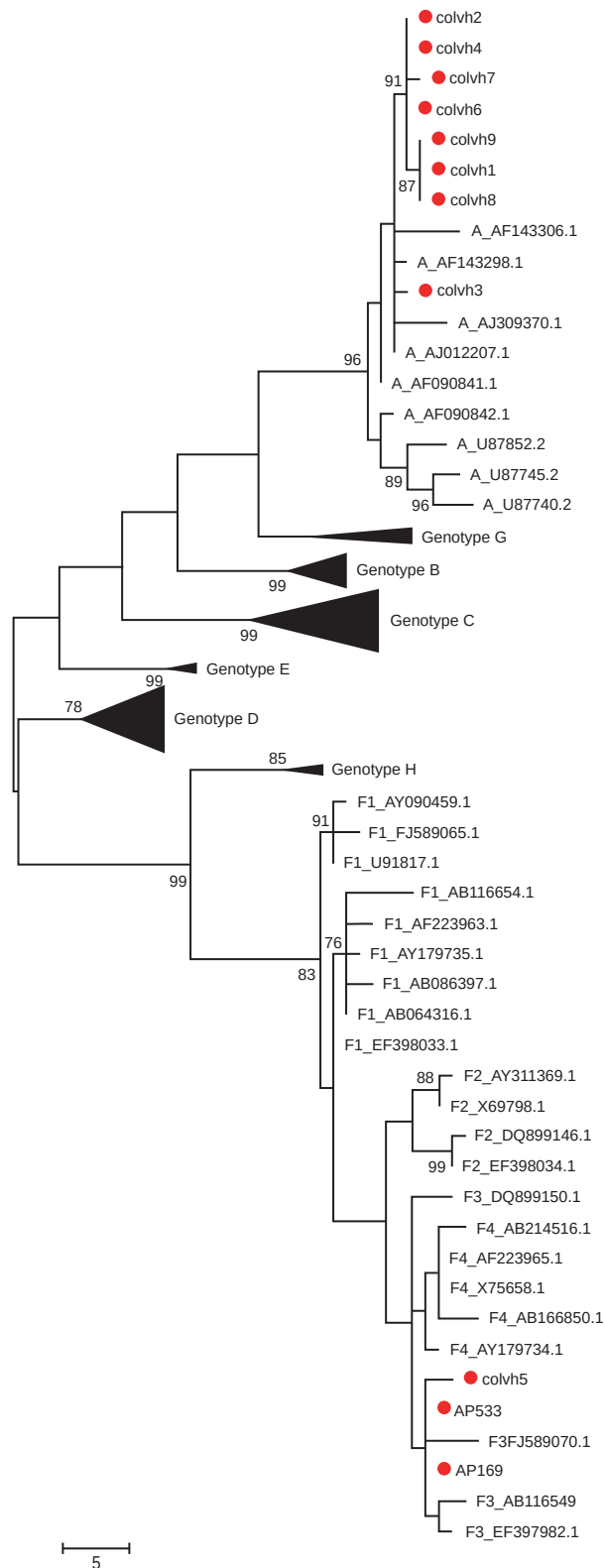


Figure 3. Unrooted parsimony phylogenetic trees of the HBV ORF S region. Colombian sequences obtained in this study (n=11) were compared with worldwide reference strains. Bootstrap: 1,000.

sequences analyzed for F1 and F2, these results suggest that the samples under study belong to subgenotype F3.

Given the results for the restriction pattern and the phylogenetic analysis, the genotypes of six samples analyzed by RFLP but not sequenced were determined based solely on the restriction pattern: Four of these samples showed pattern 3 and were classified as genotype F3, while the remaining two showed pattern 1 and were classified as genotype A (table 2, figure 2).

Genotype F, considered to be restricted to the Americas (8), has been described mainly in Colombian populations from the Andean region and Amerindians in the southeast of the country; indeed, subgenotype F3 is the most frequent in the former and F1b in the latter (Amazonas department). Meanwhile, genotype A has been very frequently found in western Colombia, where most of the population is of African descent (43-51). Additionally, an F3/A1 recombinant strain (44) and some strains of genotype E have been reported in an Afro-Colombian community (12).

HBV genotype distribution has a complex pattern in Colombia, which has not been described adequately because of the limited amount of HBV genotyping data available. In this sense, it is especially important to conduct studies in northern and eastern Colombia.

The phylogenetic analysis of the sequences included in this study showed that 72.7% (8/11) were genotype A, which represents a high proportion compared to previous reports of HBV genotypes in the country. It is important to note that we had no information about the ethnic background of the participants in this study. Genotype A has also been reported in a high proportion in studies conducted in the cities of Quibdó and Apartadó, where the population is predominantly of African descent (44,49). According to the general census of 2005, around 11% of the population in the department of Antioquia identify themselves as black, *mulato* (mixed black and white ancestry), Afro-Colombian or otherwise of African descent, while in Chocó this proportion is 82.12% (52). Genotype A might have been introduced by slaves brought to the country during the Spanish colonial period, as has been reported for other South American countries (12,53,54).

A limitation of the present study was the low proportion of positive serum samples from HBsAg and anti-HBc positive blood donors (13.3%). The

Table 1. *In silico* analysis of RFLP patterns of HBV ORF S sequences. *HpaII*, *AluI*, *CfrI*, *BsrI* and *StyI* restriction sites in the S ORF fragment in each genotype and subgenotype analyzed

Genotype/ Sub-genotype	Number of HBV sequences with the restriction site														
	Number of sequences analyzed	290 <i>HpaII</i>	291 <i>AluI</i>	300 <i>CfrI</i>	326 <i>BsrI</i>	366 <i>BsrI</i>	453 <i>StyI</i>	481 <i>AluI</i>	495 <i>AluI</i>	501 <i>BsrI</i>	505 <i>HpaII</i>	674 <i>BsrI</i>	704 <i>HpaII</i>	727 <i>BsrI</i>	757 <i>BsrI</i>
A			<i>AluI</i>	<i>CfrI</i>					<i>AluI</i>	<i>BsrI</i>					
A1	9		4	9		*	*	6	9	*					4
A2	9		8	9				*	9	8					*
A3	9		7	9				*	8	9					
A4	8		6	8			*	*	8	6					*
B				<i>CfrI</i>	<i>BsrI</i>				<i>AluI</i>						
B1	13			13	13				13		*				
B2	13			13	13				13		12				
B3	4			4	4				4		*2				
B4	6			6	6				6						
C				<i>CfrI</i>			<i>StyI</i>								
C1	14			14			13								
C2	12			12			9								
C3	6			6			5		*	*					
C4	2		*	2					*						
D				<i>CfrI</i>					<i>AluI</i>						
D1	12			12					12						*
D2	10			10					10						
D3	11			11			*	10	11						
D4	8			8				*	8			*			*
E				<i>CfrI</i>	<i>BsrI</i>				<i>AluI</i>	<i>BsrI</i>			<i>HpaII</i>		
E	10			10	1				10	9			8	*	
F		<i>HpaII</i>		<i>CfrI</i>					<i>AluI</i>						
F1	10	8		10				10	10						
F2	10	9		10				10	10						
F3	25	22		25			15	22	25			*			
F4	6	6		6			*	*	6						
G								<i>AluI</i>	<i>AluI</i>	<i>BsrI</i>					
G	9			*2				9	9	9					*
H		<i>HpaII</i>		<i>CfrI</i>					<i>AluI</i>						
H	12	12		12					12						

The new informative restriction sites appear in bold rectangles and those found with only one or two sequences are marked with asterisks (*). Positions of the restriction sites are displayed in the first row and are based on the sequence NC_003977.

Table 2. HBV genotyping by RFLP and phylogenetic analysis of serum samples obtained from patients and blood donors

Code	Sample	Genotype by RFLP		Genotype by phylogenetic analysis
		Pattern	Proposed genotype	
colvh1	Patients with clinical diagnosis of viral hepatitis	2	A	A
colvh2		1	A	A
colvh3		1	A	A
colvh4		1	A	A
colvh5		3	F	F
colvh6		1	A	A
colvh7		1	A	A
colvh8		1	A	A
colvh9		1	A	A
AP169	Asymptomatic individuals with HBV risk factors	3	F	F
AP533		3	F	F
colbd1	Blood donors	3	F	ND
colbd2		3	F	ND
colbd3		3	F	ND
colbd4		1	A	ND
colbd5		3	F	ND
colbd6		1	A	ND

ND: Not determined

efficiency of DNA extraction and the detection limit of the in-house semi-nested and nested PCRs could have had a negative impact on HBV DNA detection. HBV DNA amplification in samples from HBsAg+ blood donors was probably influenced by the low viral load, as described previously; these cases could correspond to inactive carriers (IC) of HBV infection, characterized by normal alanine aminotransferase level, HBeAg negativity and viral load $\leq 2,000$ UI/ml (55). Additionally, Gupta, *et al.* demonstrated a significant correlation between HBsAg levels and DNA HBV in samples of $>2,000$ UI/ml but not in those of $\leq 2,000$ UI/ml using real-time PCR (56). In another study, the authors evaluated in-house semi-nested PCR for HBV DNA detection performance in serum samples reactive for HBsAg comparing it with the performance of a commercial method (Cobas Amplicor HBV Monitor Assay). The HBV DNA detection by in-house semi-nested PCR showed a concordance of 67.8% with the commercial technique. The authors thus concluded that the former technique showed an adequate concordance with some limitations, being a good method in low-resource settings (57).

In conclusion, we identified a new restriction pattern specific for subgenotype F3, and provided an *in silico* analysis of informative restriction sites for genotypes A-H that complements work which has been published before. Genotypes F and A were identified in the samples by RFLP and phylogenetic analysis according to previous genotyping studies in Colombia. A more robust *in silico* analysis (i.e., one including more sequences) of the restriction patterns for HBV genotypes and subgenotypes could validate our findings, making HBV genotyping by RFLP more reliable.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Juan Camilo Olarte, from the *Banco de Sangre de la Cruz Roja Colombiana, Seccional Antioquia*.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Funding

This study was funded by *Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Antioquia* (Grant 2547 *Mediana Cuantía y Proyecto de Sostenibilidad*), and the *Instituto Tecnológico Metropolitano*.

References

1. **World Health Organization.** Hepatitis B. Date of entry: April 15, 2015. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>

2. **Lee WM.** Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med.* 1997;337:1733-45. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199712113372406>
3. **Milich D, Liang TJ.** Exploring the biological basis of hepatitis B antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* Baltimore Md. 2003;38:1075-86. <http://dx.doi.org/10.1053/jhep.2003.50453>
4. **Heise T, Sommer G, Reumann K, Meyer I, Will H, Schaal H.** The hepatitis B virus PRE contains a splicing regulatory element. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:353-63. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkj440>
5. **Norder H, Couroucé A-M, Coursaget P, Echevarría JM, Lee S-D, Mushahwar IK, et al.** Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology.* 2004;47:289-309. <http://dx.doi.org/10.1159/000080872>
6. **Campos RH, Mbayed VA, Piñeiro Y Leone FG.** Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. *J Clin Virol.* 2005;34(Suppl.2):S8-13. [http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532\(05\)80028-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532(05)80028-9)
7. **Panduro A, Maldonado-González M, Fierro NA, Román S.** Distribution of HBV genotypes F and H in México and Central America. *Antivir Ther.* 2013;18:475-84. <http://dx.doi.org/10.3851/IMP2605>
8. **Alvarado-Mora MV, Pinho JR.** Distribution of HBV genotypes in Latin America. *Antivir Ther.* 2013;18:459-65. <http://dx.doi.org/10.3851/IMP2599>
9. **Sunbul M.** Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol.* 2014;20:5427-34. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5427>
10. **Lin CL, Kao JH.** Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5:a021436. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a021436>
11. **Norder H, Couroucé AM, Magnius LO.** Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology.* 1994;198:489-503. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1994.1060>
12. **Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutiérrez MF, Carrilho FJ, Pinho JR.** Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus genotype E in an isolated Afro-Colombian community. *J Gen Virol.* 2010;91:501-8. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.015958-0>
13. **Olinger CM, Jutavijittum P, Hübschen JM, Yousukh A, Samountry B, Thammavong T, et al.** Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1777-80. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1411.080437>
14. **Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, et al.** A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol.* 2009;83:10538-47. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00462-09>
15. **Gandhi MJ, Yang GG, McMahon BJ, Vyas GN.** Hepatitis B virions isolated with antibodies to the pre-S1 domain reveal occult viremia by PCR in Alaska Native HBV carriers who have seroconverted. *Transfusion.* 2000;40:910-6. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1537-2995.2000.40080910.x>

16. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: A new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol.* 2002;83:2059-73. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-83-8-2059>
17. Devesa M, Pujol FH. Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America. *Virus Res.* 2007;127:177-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2007.01.004>
18. Zehender G, Ebranati E, Gabanelli E, Sorrentino C, Lo Presti A, Tanzi E, et al. Enigmatic origin of hepatitis B virus: An ancient travelling companion or a recent encounter? *World J Gastroenterol.* 2014;20:7622-34. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i24.7622>
19. Alvarado-Mora MV, Gutiérrez-Fernández MF, Gomes-Gouvêa MS, de Azevedo-Neto RS, Carrilho FJ, Pinho JR. Hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV) and hepatitis delta (HDV) viruses in the Colombian population –How is the epidemiological situation? *PLoS One.* 2011;6:e18888. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018888>
20. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico semanal: semana 53 de 2014. Date of entry: June 2, 2015. Available from: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiologico/2014%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2053.pdf>
21. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, et al. Typing hepatitis B Virus by homology in nucleotide sequence: Comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol.* 1988;69:2575-83. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-69-10-2575>
22. Vernet G, Tran N. The DNA-Chip technology as a new molecular tool for the detection of HBV mutants. *J Clin Virol.* 2005;34 (Suppl.1):S49-53. [http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532\(05\)80010-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532(05)80010-1)
23. Mizokami M, Nakano T, Orito E, Tanaka Y, Sakugawa H, Mukaide M, et al. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Lett.* 1999;450:66-71. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00471-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00471-8)
24. Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol.* 2001;39:362-4. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.1.362-364.2001>
25. Usuda S, Okamoto H, Iwanari H, Baba K, Tsuda F, Miyakawa Y, et al. Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product. *J Virol Methods.* 1999;80:97-112. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00039-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00039-7)
26. Osowy C, Giles E. Evaluation of the INNO-LiPA HBV genotyping assay for determination of hepatitis B virus genotype. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5473-7. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.12.5473-5477.2003>
27. Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus--Large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis.* 1997;175:1285-93. <http://dx.doi.org/10.1086/516458>
28. Lindh M, González JE, Norkrans G, Horal P. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. *J Virol Methods.* 1998;72:163-74. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(98\)00026-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00026-3)
29. Zeng GB, Wen SJ, Wang ZH, Yan L, Sun J, Hou JL. A novel hepatitis B virus genotyping system by using restriction fragment length polymorphism patterns of S gene amplicons. *World J Gastroenterol.* 2004;10:3132-6. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v10.i21.3132>
30. Venegas M, Muñoz G, Hurtado C, Álvarez L, Velasco M, Villanueva RA, et al. Prevalence of hepatitis B virus genotypes in chronic carriers in Santiago, Chile. *Arch Virol.* 2008;153:2129-32. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-008-0231-6>
31. Gulube Z, Chirara M, Kew M, Tanaka Y, Mizokami M, Kramvis A. Molecular characterization of hepatitis B virus isolates from Zimbabwean blood donors. *J Med Virol.* 2011;83:235-44. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21954>
32. Ouneissa R, Bahri O, Ben Yahia A, Touzi H, Azouz MM, Ben Mami N, et al. Evaluation of PCR-RFLP in the pre-S region as molecular method for hepatitis B virus genotyping. *Hepat Mon.* 2013;13:e11781. <http://dx.doi.org/10.5812/hepatmon.11781>
33. Hall T. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;41:95-8.
34. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28:2731-9. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>
35. Nabuco LC, Mello FC, Gomes S de A, Perez RM, Soares JA, Coelho HS, et al. Hepatitis B virus genotypes in Southeast Brazil and its relationship with histological features. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107:785-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000600013>
36. Gopalakrishnan D, Keyter M, Shenoy KT, Leena KB, Thayumanavan L, Thomas V, et al. Hepatitis B virus subgenotype A1 predominates in liver disease patients from Kerala, India. *World J Gastroenterol.* 2013;19:9294-306. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v19.i48.9294>
37. Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol.* 2008;82:5657-63. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02556-07>
38. Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyaei S, Lemey P, Maes P, van Ranst M. Are hepatitis B virus "subgenotypes" defined accurately? *J Clin Virol.* 2010;47:356-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2010.01.015>
39. Hübschen JM, Mbah PO, Forbi JC, Otegbayo JA, Olinger CM, Charpentier E, et al. Detection of a new subgenotype of hepatitis B virus genotype A in Cameroon but not in neighbouring Nigeria. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:88-94. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03205.x>
40. Thedja MD, Muljono DH, Nurainy N, Sukowati CH, Verhoef J, Marzuki S. Ethnogeographical structure of hepatitis B virus genotype distribution in Indonesia and discovery of a new subgenotype, B9. *Arch Virol.* 2011;156:855-68. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-011-0926-y>
41. Mulyanto, Pancawardani P, Depamede SN, Wahyono A, Jirintai S, Nagashima S, et al. Identification of four novel subgenotypes (C13-C16) and two inter-genotypic recombinants (C12/G and C13/B3) of hepatitis B virus in Papua province, Indonesia. *Virus Res.* 2012;163:129-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.002>

42. **Abdou Chekaraou M, Brichler S, Mansour W, Le Gal F, Garba A, Dény P, et al.** A novel hepatitis B virus (HBV) subgenotype D (D8) strain, resulting from recombination between genotypes D and E, is circulating in Niger along with HBV/E strains. *J Gen Virol.* 2010;91:1609-20. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.018127-0>
43. **Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutiérrez MF, Carrilho FJ, Pinho JR.** Dynamics of hepatitis D (delta) virus genotype 3 in the Amazon region of South America. *Infect Genet Evol.* 2011;11:1462-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.05.020>
44. **Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutiérrez MF, Carrilho FJ, Pinho JR.** Phylogenetic analysis of complete genome sequences of hepatitis B virus from an Afro-Colombian community: Presence of HBV F3/A1 recombinant strain. *Virol J.* 2012;9:244. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-9-244>
45. **Bautista-Amoroch H, Castellanos-Domínguez YZ, Rodríguez-Villamizar LA, Velandia-Cruz SA, Becerra-Peña JA, Farfán-García AE.** Epidemiology, risk factors and genotypes of HBV in HIV-infected patients in the Northeast region of Colombia: High prevalence of occult hepatitis B and F3 subgenotype dominance. *PLoS One.* 2014;9:e114272. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0114272>
46. **Cortés-Mancera F, Loureiro CL, Hoyos S, Restrepo JC, Correa G, Jaramillo S, et al.** Etiology and viral genotype in patients with end-stage liver diseases admitted to a hepatology unit in Colombia. *Hepat Res Treat.* 2011;2011:363205. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/363205>
47. **Devesa M, Loureiro CL, Rivas Y, Monsalve F, Cardona N, Duarte MC, et al.** Subgenotype diversity of hepatitis B virus American genotype F in Amerindians from Venezuela and the general population of Colombia. *J Med Virol.* 2008;80:20-6. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21024>
48. **Ríos-Ocampo WA, Cortés-Mancera F, Olarte JC, Soto A, Navas MC.** Occult hepatitis B virus infection among blood donors in Colombia. *Virol J.* 2014;11:206. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-014-0206-z>
49. **Ríos D, di Filippo D, Insuasty M, Rendón JC, Ríos WA, Medina C, et al.** Hepatitis B infections in individuals with exposure factors in Quibdó and Apartadó, Colombia. *Rev Col Gastroenterol.* 2015;30:11-8.
50. **Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutiérrez MF, Botelho L, Carrilho FJ, et al.** Molecular characterization of the hepatitis B virus genotypes in Colombia: A Bayesian inference on the genotype F. *Infect Genet Evol.* 2011;11:103-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2010.10.003>
51. **di Filippo Villa D, Cortés-Mancera F, Payares E, Montes N, de la Hoz F, Arbeláez MP, et al.** Hepatitis D virus and hepatitis B virus infection in Amerindian communities of the Amazonas state, Colombia. *Virol J.* 2015;12:172. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0402-5>
52. **Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE).** Censo general. Bogotá, D.C.: DANE; 2005.
53. **Quintero A, Martínez D, Alarcón De Noya B, Costagliola A, Urbina L, González N, et al.** Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Afro-Venezuelan populations. *Arch Virol.* 2002;147:1829-36. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-002-0842-2>
54. **Motta-Castro AR, Martins RM, Yoshida CF, Teles SA, Paniago AM, Lima KM, et al.** Hepatitis B virus infection in isolated Afro-Brazilian communities. *J Med Virol.* 2005;77:188-93. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.20435>
55. **Martinot-Peignoux M, Lapalus M, Laouénan C, Lada O, Netto-Cardoso AC, Boyer N, et al.** Prediction of disease reactivation in asymptomatic hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients using baseline serum measurements of HBsAg and HBV-DNA. *J Clin Virol.* 2013;58:401-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.08.010>
56. **Gupta E, Kumar A, Choudhary A, Kumar M, Sarin SK.** Serum hepatitis B surface antigen levels correlate with high serum HBV DNA levels in patients with chronic hepatitis B: A cross-sectional study. *Indian J Med Microbiol.* 2012;30:150-4. <http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.96664>
57. **Portilho MM, Baptista ML, da Silva M, de Sousa PS, Lewis-Ximenez LL, Lampe E, et al.** Usefulness of in-house PCR methods for hepatitis B virus DNA detection. *J Virol Methods.* 2015;223:40-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.07.010>

ARTÍCULO ORIGINAL

Caracterización del estado de salud de las personas en su periodo de convalecencia de un episodio de dengue

Laura Lizeth Luengas¹, Diana Carolina Tiga², Víctor Mauricio Herrera¹, Luis Ángel Villar-Centeno^{1,3}

¹ Grupo de Epidemiología Clínica, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

² Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México

³ Red AEDES - Abordando Áreas Endémicas del Dengue para el Estudio de su Severidad (sic), Bucaramanga, Colombia

Introducción. El dengue y sus manifestaciones agudas se han descrito ampliamente en la literatura, sin embargo, los síntomas en la fase de convalecencia se han estudiado poco.

Objetivo. Describir las manifestaciones clínicas de una población durante su periodo de convalecencia de un episodio de dengue.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio observacional en sujetos que estuvieron hospitalizados con dengue diagnosticado por serología. Después del alta se les visitó para evaluar la persistencia de la sintomatología clínica, la fatiga (evaluada mediante el *Fatigue Questionnaire* de Chalder) y la calidad de vida (evaluada mediante el cuestionario EuroQoL-5D). Se determinó como fatiga significativa aquella con un puntaje igual o superior a cuatro en la escala empleada. Se hizo seguimiento telefónico y domiciliario de los participantes con fatiga hasta tres meses después del alta hospitalaria.

Resultados. La prevalencia de fatiga en los 32 sujetos seleccionados (edad media: 35 años, sexo femenino: 59 %) fue de 34,4 % (IC_{95%} 17,0-51,8). No se observaron diferencias sociodemográficas en relación con la fatiga, pero sí con relación a una mayor frecuencia de cansancio físico (100,0 % Vs. 47,6 %; p=0,005) y mental (54,6 % Vs. 9,5 %; p=0,010). Aunque los pacientes con fatiga reportaron una peor calidad de vida, esta no fue estadísticamente diferente a la del grupo sin fatiga al ajustar por edad y sexo (OR=5,5; IC_{95%} 0,83-36,5). Además, el puntaje de fatiga decayó en promedio medio punto por cada diez días de seguimiento (p=0,007).

Conclusiones. Estos resultados demuestran que la carga de enfermedad de la infección por el virus del dengue no se ha descrito del todo, pues en la fase de convalecencia se siguen presentando síntomas clínicos que dificultan la recuperación normal del individuo.

Palabras clave: dengue, signos y síntomas, costo de la enfermedad, fatiga, calidad de vida.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.3019>

Characterization of the health condition of people convalescing from a dengue episode

Introduction: Although dengue and its acute manifestations have been broadly described in the literature, the symptoms during the convalescence phase have so far been little studied.

Objective: To describe the clinical manifestations of a population during the convalescence phase from a dengue episode.

Materials and methods: We conducted an observational study in individuals that were in the hospital after being serologically diagnosed with dengue. After being discharged from the hospital, they were visited in order to verify the persistence of clinical symptoms, fatigue (assessed using the Chalder's Fatigue Questionnaire) and quality of life (assessed with the EuroQoL-5D questionnaire). Significant fatigue was defined with a score equal to or greater than four in the corresponding scale. Participants with positive [+] fatigue signs were supervised by phone and/or by visiting them in their places of residence until the symptoms disappeared, with a maximum follow-up term of three months.

Results: We included 32 individuals in the study (average age: 35 years old, 59% women) and a fatigue prevalence of 34.4% was observed (CI 95% 17.0-51.8). Sociodemographic differences were not defined as determinants with regard to fatigue; by contrast, we found a greater frequency of physical tiredness (100% vs 47.6%; p=0.005) and mental tiredness (54.6% vs 9.5%; p=0.010). Even though

Contribución de los autores:

Laura Lizeth Luengas: recolección e interpretación de los datos, obtención de los resultados

Luis Ángel Villar-Centeno: diseño del estudio y análisis e interpretación de los datos

Diana Carolina Tiga: diseño del estudio

Víctor Mauricio Herrera: análisis e interpretación de los datos

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

patients with fatigue had a poor quality of life, this sign was not statistically different from the group not reporting fatigue when we adjusted by age and sex (OR=5.5; CI 95% 0.83-36.5). In addition, fatigue scores dropped half point in average every 10 days of follow-up.

Conclusions: Our results demonstrated that the burden of disease in dengue has not been entirely described, as clinical signs are still present during the convalescence phase, and this represents an obstacle for the normal recovery of individuals.

Key words: Dengue, signs and symptoms, cost of illness, fatigue, quality of life.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.3019>

El dengue es una enfermedad viral transmitida principalmente por el vector *Aedes aegypti* y se considera un problema de salud pública, ya que cerca de la mitad de la población mundial está en riesgo de padecerla. Además, se encuentra en continua expansión geográfica, y a ello se suman la circulación simultánea de cuatro serotipos y ciclos epidémicos cada vez más frecuentes e intensos, lo cual ha generado un impacto en la carga de la enfermedad y en los costos que representa (1,2). Sin embargo, la carga y los costos posiblemente se han subestimado debido a la disponibilidad, la calidad y el uso de la información, pues no se cuenta con fuentes de notificación estandarizada en los países donde está presente la enfermedad (1).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que dos quintas partes de la población mundial están en riesgo de ser infectadas por el virus del dengue y más de cien países se han visto afectados por epidemias de dengue y dengue grave en los últimos años. Cada año se reportan alrededor de 50 millones de casos, de los cuales cerca de 500.000 son hospitalarios y 20.000 terminan en fallecimientos (3). En el continente americano se considera que la magnitud del problema del dengue seguirá creciendo, en especial en América Latina, debido al alarmante aumento del vector y a la falta de su control efectivo. Asimismo, la urbanización rápida y desorganizada de las ciudades, el cambio climático y el aumento de los barrios de escasos recursos a causa de la migración de la población rural a las ciudades, contribuyen a este problema (2-4).

En Colombia, el periodo de mayor impacto de la enfermedad se presentó en el 2010, cuando el país experimentó la más grande epidemia de dengue en su historia; en ese año, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica (Sivigila) reportó 157.152 casos de dengue, de los cuales 94 % correspondió a dengue (147.670 casos) y el 6 % restante a dengue grave (9.482 casos). Además, se confirmaron 217 muertes, es decir, una letalidad de 2,28 % (5,6). Hasta la semana epidemiológica 12 del 2015 se habían notificado al Sivigila 25.959 casos de dengue, de los cuales 25.530 (98,3 %) correspondían a dengue y, 429 (1,7 %), a dengue grave. En comparación con el 2014, se presentó un aumento de 1,84 % en el número de casos (7). Por otra parte, en el departamento de Santander la mortalidad por dengue ocupa el primer lugar entre las enfermedades transmitidas por vectores (8).

Con base en los datos sobre la frecuencia de aparición del dengue, es evidente que representa un problema de salud pública; sin embargo, su magnitud también está determinada por otros factores como la gravedad, la carga de la enfermedad y la discapacidad que puede generar (9). La carga se puede cuantificar utilizando un conjunto de indicadores epidemiológicos, entre ellos, los años de vida perdidos ajustados por discapacidad (AVAD) (10), los cuales se han evaluado en diversos estudios llevados a cabo durante la fase aguda del dengue (10-13).

Alrededor de 60 % de los costos del dengue en las Américas son indirectos. La mayor parte de este porcentaje corresponde a la pérdida de productividad debida a los casos de dengue no complicado (14). En Colombia, la carga del dengue es alta: en el 2011 se estimó que alrededor de 35.700 casos requirieron atención médica, lo cual tuvo un gran impacto económico en el sistema de salud, ya que el costo total del dengue representó cerca del 0,02 % del producto interno bruto del país (15).

Shepard, *et al.*, señalan que para el 2011 el número de AVAD por año en Brasil era de alrededor de 36 %, de 28 % en la región andina y de 21 %

Correspondencia:

Laura Lizeth Luengas, Centro de Investigaciones Epidemiológicas, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Carrera 32 N° 29-31, oficina 304, Bucaramanga, Colombia
Teléfono: (577) 634 4000, extensión 3205; fax: (577) 634 5781
laura_marin7@hotmail.com

Recibido: 04/08/15; aceptado: 03/12/15

en América Central y México. En las Américas el dengue ocupa el quinto lugar en la lista de las enfermedades tropicales desatendidas en términos de AVAD (14).

Por otra parte, el periodo de convalecencia de esta enfermedad, así como la persistencia de síntomas después de la fase aguda, se ha estudiado poco, por lo que profundizar en este aspecto podría ser interesante para determinar si hay algún incremento en la carga de la enfermedad debido a la persistencia de complicaciones y si estas se podrían catalogar como incapacitantes.

En estudios previos se ha reportado que los problemas de salud persisten después de la fase aguda; en su estudio, González, *et al.*, señalan que 46,8 % de los síntomas del dengue se prolongaron durante seis meses después de la resolución de la enfermedad (16). López, *et al.*, describieron la presencia de síntomas hasta un año después del episodio de dengue en mujeres embarazadas infectadas con el serotipo 3 (17). Por otro lado, en el estudio de Seet, *et al.*, se describió un síndrome de fatiga después de la infección en 24,4 % de los pacientes dos meses después de su alta hospitalaria (18).

Cabe resaltar que el dengue se ha descrito ampliamente en su periodo febril y crítico, pero son pocos los estudios sobre la persistencia de manifestaciones como el decaimiento, la fatiga y la pérdida de la agilidad mental para realizar las actividades de la vida cotidiana, después de un episodio agudo de la enfermedad; por esta razón, el objetivo de este estudio fue describir las manifestaciones clínicas de una población durante su periodo de convalecencia de un episodio de dengue.

Materiales y métodos

Diseño del estudio y población

Se llevó a cabo un estudio observacional en las instituciones de III nivel de complejidad del área metropolitana de Bucaramanga (Hospital Universitario de Santander, Clínica Chicamocha y Clínica SaludCoop, sedes Conucos y Cañaveral), entre diciembre del 2013 y marzo del 2014.

Se incluyeron pacientes entre los 18 y los 60 años de edad, que habían estado hospitalizados con diagnóstico de dengue confirmado por detección de IgM mediante ELISA. Se excluyeron aquellos sujetos que no tenían un número telefónico, así como aquellos con discapacidad auditiva o

mental o con alguna enfermedad autoinmunitaria, alguna condición reumatológica grave o algún tipo de fibromialgia.

Recolección de la información

Para la recolección de los datos sobre las características sociodemográficas y la información clínica (síntomas y gravedad de la infección), se elaboró un instrumento de base y se extrajo información complementaria de las historias clínicas suministradas por las instituciones de salud, con previa autorización de los pacientes. Los resultados de las pruebas de diagnóstico de dengue por laboratorio se obtuvieron con la autorización de la Secretaría de Salud Departamental a partir de los registros de vigilancia epidemiológica o de los registros suministrados por los laboratorios clínicos de las instituciones participantes.

Inicialmente, se entrevistó personalmente a los pacientes entre los 15 días y los tres meses después del egreso hospitalario, y se indagó sobre algunas características sociodemográficas, así como sobre los síntomas, la gravedad de la enfermedad, la aparición de la fatiga por dengue y la calidad de vida en el momento de la entrevista. A los pacientes con tres o más puntos en el cuestionario de fatiga se les hizo un seguimiento telefónico o domiciliario cada 15 días hasta la desaparición de los síntomas, el cual no superó en ningún caso los tres meses.

Evaluación de la fatiga y la calidad de vida

La fatiga y el nivel de calidad de vida se midieron mediante los cuestionarios *Fatigue Questionnaire* (FQ) de Chalder, *et al.* (18,19), y el EuroQol-5D, el cual mide la calidad de vida relacionada con la salud en la atención primaria y fue validado para su uso en español (20-23). Los cuestionarios se utilizaron conjuntamente con el instrumento de base sobre los síntomas durante la visita inicial y, posteriormente, durante los seguimientos telefónicos o domiciliarios cada 15 días.

El FQ es un cuestionario validado con 11 ítems que miden los síntomas de fatiga física y mental del individuo (19). La fatiga prolongada se define como una sensación incapacitante caracterizada por un cansancio intenso que no mejora con el descanso y que puede empeorar con el esfuerzo físico o mental, acompañada de una combinación de síntomas, entre los cuales se destacan los relacionados con la concentración, la memoria, los trastornos del sueño y el dolor musculoesquelético (24-26).

Siete de los ítems del cuestionario miden la fatiga física y, cuatro, la fatiga mental, en una escala de cuatro (0=ninguna; 1=leve; 2=moderada; 3=grave).

La literatura reporta como óptimo un punto de corte de 3 a 4 puntos en esta escala cuando se usa de manera dicotómica (la opción de respuesta de "ninguna" equivale a 0 y, las de "leve, moderada o grave", a 1) con un área bajo la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) de 0,85 (19).

Al no encontrar criterios específicos aplicados a la definición de la fatiga posterior a una infección (24-26), se escogió de manera arbitraria el punto de corte de cuatro en el cuestionario FQ, y el seguimiento de los pacientes se estableció cada 15 días hasta la desaparición de los síntomas, sin superar en ningún caso los tres meses después del egreso hospitalario.

El cuestionario EuroQol-5D se adaptó para ser empleado por el encuestador, y solo se recurrió a la parte de las preguntas, mas no a la escala visual análoga contenida en el cuestionario completo.

Clasificación del resultado de la enfermedad

Los participantes del estudio se clasificaron según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (27). El dengue tiene un amplio espectro de presentaciones clínicas, a menudo con un resultado clínico impredecible debido a que la mayoría de los pacientes se recupera después de un curso clínico benigno de resolución espontánea; otros, sin embargo, evolucionan a las formas más graves de la enfermedad, siendo característico el aumento de la permeabilidad vascular con hemorragia o sin ella.

Se empleó la clasificación del dengue y de su nivel de gravedad propuesta por la OMS: 1) dengue sin signos de alarma, es decir, el que se presenta en una persona que vive en un área endémica de dengue o ha viajado en los últimos días a una de ellas con un cuadro clínico caracterizado por fiebre y dos o más de las siguientes manifestaciones: náuseas, vómitos, diarrea, mialgias, artralgias, petequias o leucopenia; 2) dengue con signos de alarma, el cual se caracteriza por presentar el cuadro clínico anterior más la presencia de las siguientes manifestaciones: dolor abdominal intenso o continuo, vómitos persistentes, acumulación de líquidos, sangrado de mucosas, letargia, irritabilidad, hepatomegalia de más de 2 cm, y parámetros de laboratorio indicativos de aumento del hematocrito con una rápida disminución del recuento de plaquetas, y 3) dengue grave, el cual

se caracteriza por un escape importante de fluidos (choque o acumulación de líquidos en pulmón y disnea), hemorragia grave y daño importante de órganos (en hígado: aspartato aminotransferasa o alanina transaminasa mayor o igual a 1.000; alteraciones del sistema nervioso central: encefalitis, encefalopatía, síndromes convulsivos, etc.), y daño en el corazón y otros órganos (27).

Análisis estadístico

Los datos se describen con medias (desviación estándar, DE) para las variables continuas y conteos (porcentajes) para las discretas. Para las diferencias entre los grupos con fatiga y sin ella, se usaron pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis y la prueba exacta de Fisher). La asociación entre fatiga y calidad de vida se estimó mediante regresión logística, ajustando por edad y sexo. Además, la tasa de cambio en el puntaje de fatiga durante el seguimiento se estimó mediante coeficientes de regresión lineal, corrigiendo por la correlación entre observaciones de los mismos pacientes en el tiempo. Se definió el nivel de significación estadística en 5 % (prueba de dos colas). Todos los análisis se desarrollaron en el programa estadístico Stata/MP 12.1 (Stata Corp LP).

Consideraciones éticas

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito, antes de la entrevista y el diligenciamiento de los cuestionarios.

Resultados

Se captaron 38 pacientes entre diciembre del 2013 y marzo del 2014 en las instituciones participantes (Hospital Universitario de Santander, Clínica Chicamocha, Clínica SaludCoop, sedes Conucos y Cañaveral), de los cuales se excluyeron tres por no tener confirmación serológica del diagnóstico (IgM negativa o dudosa), otros dos debido a enfermedades concomitantes consideradas en los criterios de exclusión y detectadas en el momento de la entrevista o en la revisión de las historias clínicas, y uno más porque su manejo clínico inicial fue ambulatorio.

Finalmente, se incluyeron 32 pacientes en el estudio y se comenzó su seguimiento mediante llamadas telefónicas o visitas domiciliarias cada 15 días hasta la desaparición de los síntomas o hasta completar tres meses de su egreso hospitalario.

La tasa de respuesta de los participantes que dieron su consentimiento para participar en el estudio fue de 100 %. En cuanto al nivel de fatiga, 11 (34,4 %) de los pacientes (IC_{95%} 17,0-51,8) presentaron cuatro o más síntomas en la escala del cuestionario FQ, entre los cuales los problemas para descansar (59,4 %), la debilidad (53,1 %), la falta de energía (43,8 %) y la percepción de necesitar más descanso (43,8 %), fueron los más frecuentemente reportados. En cuanto a los parámetros de fatiga mental evaluados, se evidenció que los problemas de memoria y la dificultad para concentrarse se presentaron en 12,5 % de los pacientes encuestados durante el periodo de convalecencia (cuadro 1).

La edad media de la muestra fue de 35 años (DE=10,8; rango: 18 a 60 años) y participaron 19 (59,4 %) mujeres (cuadro 2). Trece de los pacientes (40,6 %) reportaron un nivel educativo superior al de secundaria y se desempeñaban como empleados. Con respecto a la afiliación al sistema de seguridad social en salud, 18 (56,3 %) pertenecían al régimen contributivo. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las características sociodemográficas entre pacientes con fatiga y sin ella.

Diez (31,3 %) de los pacientes evaluados habían sido diagnosticados con dengue grave, 17 (53,17 %), con dengue con signos de alarma y, cinco (15,6 %), con dengue sin signos de alarma. No se observaron diferencias en cuanto a la presencia de fatiga en relación con la presentación clínica de la enfermedad. Como era de esperarse, durante la convalecencia (a partir de los 15 días del inicio de la enfermedad) se observó una mayor frecuencia de los reportes de cansancio físico (100,0 % Vs.

47,6 %; $p=0,005$) y cansancio mental (54,6 % Vs. 9,5 %; $p=0,010$) entre pacientes con fatiga y sin ella, respectivamente (cuadro 3).

Al establecer una dicotomía en la duración del seguimiento a los 19 días (mediana) entre los signos y síntomas evaluados, solo se observó una reducción estadísticamente significativa en el reporte de mareo: 43 % Vs. 6,3 %, respectivamente (figura 1).

Se encontró que los pacientes con fatiga presentaron un mayor compromiso de la calidad de vida comparados con aquellos sin fatiga (54,6 % Vs. 14,3 %; $p=0,035$), principalmente, una mayor frecuencia del reporte de dificultades para la realización de las actividades cotidianas (54,6 % Vs. 4,8 %; $p=0,003$) (cuadro 4). Esta diferencia no se mantuvo una vez se ajustó por la edad y el sexo de los pacientes (OR=5,5; IC_{95%} 0,83-36,5).

Por último, se evaluó la trayectoria del puntaje de fatiga en función de la duración del seguimiento después del egreso hospitalario (figura 2). Se estimó un decremento promedio de aproximadamente medio punto en la escala del FQ por cada 10 días de seguimiento (IC_{95%} 0,13-0,76 puntos; $p=0,007$). Al observar las líneas grises en esta figura, se evidencia la trayectoria del decremento de la fatiga en el tiempo, en tanto que la línea negra muestra la estimación grupal de dicho decremento.

Discusión

En el estudio se describieron algunas características de la convalecencia, como los síntomas clínicos, la calidad de vida y la fatiga, en pacientes hospitalizados con diagnóstico de dengue confirmado mediante serología. Estos resultados muestran la persistencia de síntomas después

Cuadro 1. Proporción de los ítems con alteraciones según la escala de fatiga en la evaluación de línea de base

Dominio	Ítem*	Prevalencia (IC _{95%})
Síntomas físicos	1. Problemas para descansar	59,4 (41,4-77,4)
	2. Problemas para comenzar alguna actividad	21,9 (6,7-37,0)
	3. Debilidad	53,1 (34,9-71,4)
	5. Necesidad de descansar más de lo habitual	43,8 (25,6-61,9)
	6. Falta de energía	43,8 (25,6-61,9)
	9. Somnolencia o sueño exagerado	15,6 (2,3-28,9)
	10. Debilidad muscular	28,1 (11,7-44,6)
Síntomas mentales	4. Problemas para articular las palabras	0,0 (...)
	7. Dificultad para concentrarse	12,5 (0,1-24,6)
	8. Problemas de memoria o para recordar las cosas	12,5 (0,1-24,6)
Fatiga†	11. Problemas para pensar con claridad	0,0 (...)
		34,4 (17,0-51,8)

* Definida como una reacción leve, moderada o grave al ítem

† Puntaje total en la escala de fatiga igual o superior a cuatro puntos

de la fase aguda, entre los cuales predominó el cansancio físico (65,6 %), la cefalea (37,5 %), el insomnio (31,3 %), el mareo, el cansancio mental (25 %) y el dolor muscular (18,8 %). Estos hallazgos coinciden con las observaciones registradas en otros estudios (16,28-30). Al evaluar la presencia de fatiga física y mental después de la infección aguda por dengue, se evidenció que esta se mantuvo en 34,4 % de los pacientes durante su convalecencia, con síntomas como el

cansancio (59,4 %), la debilidad (53,1 %), la falta de energía y la necesidad de descansar más de lo habitual (43,8 %). En cuanto a la fatiga mental, se observaron alteraciones en la memoria y dificultad para concentrarse (12,5 %). Datos similares se registraron en un estudio que evaluó los síntomas clínicos durante la convalecencia de mujeres que sufrieron dengue de serotipo 3 durante su embarazo (17), y en un estudio que evaluó la persistencia de alteraciones clínicas y hepáticas en pacientes adultos dos meses después de la fase aguda del dengue (30).

La fatiga se ha demostrado en múltiples enfermedades crónicas (31,32), pero son muy pocos los estudios que describen su incidencia en enfermedades infecciosas febriles agudas, como el dengue y la fiebre del río Ross (18), las cuales cursan con manifestaciones clínicas muy similares. Los estados de fatiga prolongada después de las infecciones son comunes y pueden ser incapacitantes para las personas que los padecen. En cuanto a su duración, se ha reportado que pueden persistir durante 12 meses o más, y que pueden convertirse en estados de fatiga crónica (26,33). Aunque la fase aguda de las infecciones puede variar, la fatiga se presenta con características clínicas similares en estas enfermedades (33). Su etiología aún no se ha descrito con precisión,

Cuadro 2. Características sociodemográficas y su relación con la presencia de fatiga

Característica	Fatiga*			
	Todos (n=32)	[-] (n=21)	[+] (n=11)	p
Edad (años)	35,0 (10,8)	33,3 (10,8)	38,2 (10,6)	0,171
Sexo femenino	19 (59,4)	11 (52,4)	8 (72,3)	0,450
Escolaridad				
Primaria	10 (31,3)	7 (33,3)	3 (27,3)	0,594
Bachillerato	13 (40,6)	8 (38,1)	5 (45,4)	
Técnico	6 (18,8)	3 (14,3)	3 (27,3)	
Profesional	3 (9,3)	3 (14,3)	0 (0,0)	
Ocupación				
Hogar	9 (28,1)	6 (28,5)	3 (27,2)	0,401
Estudiante	3 (9,4)	3 (14,3)	0 (0,0)	
Empleado	13 (40,6)	9 (42,9)	4 (36,4)	
Independiente	7 (21,9)	3 (14,3)	4 (36,4)	
Régimen contributivo	18 (56,3)	11 (52,4)	7 (63,6)	0,712

* Puntaje total en la escala de fatiga igual o superior a cuatro puntos

Cuadro 3. Características clínicas durante la infección aguda por dengue y durante la convalecencia según la presencia de fatiga

Característica	Fatiga*			
	Todos (n=32)	[-] (n=21)	[+] (n=11)	P
Dengue				
Sin signos de alarma	5 (15,6)	4 (19,1)	1 (9,1)	0,158
Con signos de alarma	17 (53,1)	13 (61,8)	4 (36,4)	
Grave	10 (31,3)	4 (19,1)	6 (54,5)	
Síntomas y signos				
Cefalea	12 (37,5)	6 (28,6)	6 (54,6)	0,250
Dificultad para concentrarse	3 (9,4)	2 (9,5)	1 (9,1)	1,000
Pérdida de memoria	4 (12,5)	2 (9,5)	2 (18,2)	0,593
Insomnio	10 (31,3)	6 (28,6)	4 (36,4)	0,703
Artralgia	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	...
Mialgia	6 (18,8)	2 (9,5)	4 (36,4)	0,148
Cansancio mental	8 (25,0)	2 (9,5)	6 (54,6)	0,010
Cansancio físico	21 (65,6)	10 (47,6)	11 (100,0)	0,005
Mareo	8 (25,0)	3 (14,3)	5 (45,5)	0,088
Disminución del apetito	4 (12,5)	2 (9,5)	2 (18,2)	0,593
Dolor abdominal	2 (6,3)	2 (9,5)	0 (0,0)	0,534
Trastorno digestivo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	...
Petequias	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	...
Exantema	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	...
Sangrado genital anormal	2 (6,3)	0 (0,0)	2 (18,2)	0,111
Otro	2 (6,3)	2 (9,5)	0 (0,0)	0,534

* Puntaje total en la escala de fatiga igual o superior a cuatro puntos

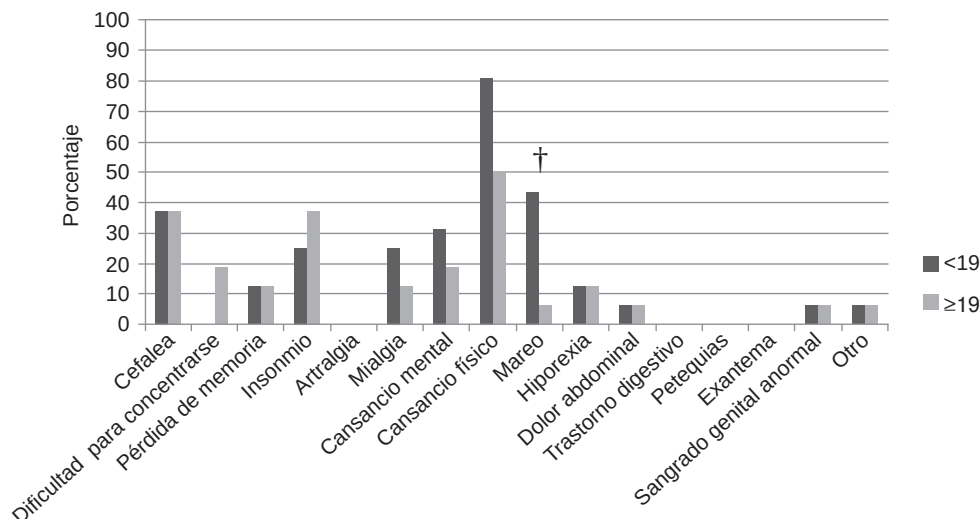


Figura 1. Prevalencia de signos y síntomas de acuerdo con el tiempo* transcurrido entre la hospitalización y la evaluación basal

* Con dicotomía en la mediana del tiempo (19 días)

† $p < 0,05$ en la prueba exacta de Fisher

Cuadro 4. Calidad de vida evaluada con el cuestionario Euro QoL-5D y su relación con la presencia de fatiga

Ítem	Fatiga*			p
	Todos (n=32)	[-] (n=21)	[+] (n=11)	
EuroQoL-5D [†]				
Movilidad	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	...
Cuidado personal	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	...
Actividades cotidianas	7 (21,9)	1 (4,8)	6 (54,6)	0,003
Dolor o malestar	1 (3,1)	0 (0,0)	1 (9,1)	1,000
Ansiedad o depresión	4 (12,5)	2 (9,5)	2 (18,2)	0,593
EuroQoL-5D ($\geq 1/5$) [‡]	9 (28,1)	3 (14,3)	6 (54,6)	0,035

* Puntaje total en la escala de fatiga igual o superior a cuatro puntos

† Presencia de ítems alterados en los que el paciente reportó algún grado de problema

‡ Reporte de al menos un ítem con alteraciones de los cinco evaluados

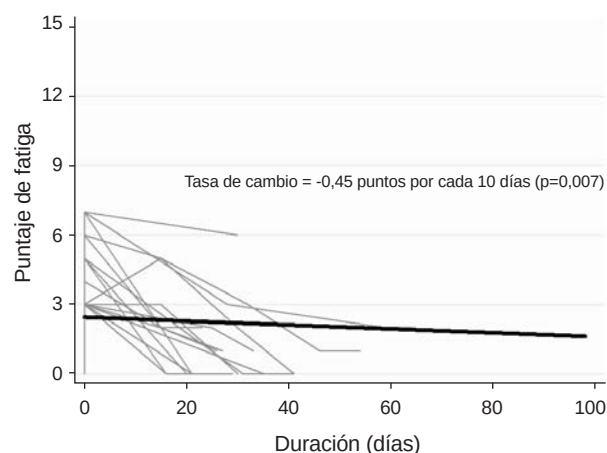


Figura 2. Trayectorias del puntaje de fatiga

pero una de las hipótesis plantea su origen fisiopatológico debido a la existencia de un patrón único de infección con un patógeno conocido o nuevo, de una reacción inmunitaria anormal a ese determinado agente patógeno, y una respuesta psicológica del individuo frente a la infección o a otros estímulos que aparecen cuando la persona está 'frágil'; sumado a ello, es posible encontrar alteraciones metabólicas o neuroendocrinas provocadas por algún detonador desconocido, y una perturbación inmunitaria neurológica desencadenada por la infección aguda (34).

El hecho de que la fatiga después de la infección sea más frecuente en mujeres mayores, sugeriría que los factores relacionados con el huésped son importantes en la etiología de la fatiga producida por una enfermedad febril aguda. En otros estudios se han reportado datos similares sobre estas características sociodemográficas y su relación con la persistencia de los síntomas después de la fase aguda del dengue (18,35). En cuanto a la gravedad del dengue, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, tal como se reportó en otro estudio en pacientes con dengue dos meses después de la infección por el virus (18).

Se observó alteración de la calidad de vida en 28 % de los pacientes evaluados en el periodo de convalecencia después del episodio agudo de dengue, especialmente en su capacidad para retomar las actividades cotidianas de forma normal. Asimismo, al evaluar este ítem en los pacientes

con fatiga y sin ella, la reducción de dicha capacidad se observó en 54,6 % y en 14,3 % de los participantes, respectivamente.

Cabe resaltar algunas de las limitaciones de este estudio: en primer lugar, el momento de la entrevista inicial (línea basal) no fue el mismo para todos los pacientes, pues esta se hizo a medida que iban ingresando al estudio, por lo que no se pudo establecer o comparar si había alguna diferencia en la presencia de fatiga en relación con el número de días transcurridos desde el alta hospitalaria. La segunda limitación se refiere al instrumento utilizado para la medición de la fatiga, ya que este no se ha validado en el idioma español y para nuestro contexto cultural, por lo que se recomienda que en futuros trabajos se empleen instrumentos validados para evaluar la fatiga general en los pacientes.

Por otra parte, en el estudio solo se incluyeron participantes que estuvieron hospitalizados y con diagnóstico de dengue confirmado, sin tener en cuenta a aquellos con tratamiento inicial ambulatorio. Igualmente, sería interesante que en futuros estudios se incluyera un grupo de comparación externo que permita describir mejor la prevalencia basal de la fatiga después de un episodio agudo de dengue. Tampoco se evaluó si la presencia de otra infección durante el periodo de convalecencia influye en la persistencia de los síntomas. Sin embargo, este estudio aporta una descripción valiosa del periodo de convalecencia del dengue. Cabe resaltar que los resultados de los estudios mencionados coinciden con los de este trabajo, los cuales, aunque no son contundentes, sirven de punto de partida para estudios futuros que establezcan los marcadores clínicos o biológicos de la persistencia de síntomas después de la infección por dengue.

Los resultados descritos en este trabajo demuestran que la carga de enfermedad del dengue no se ha determinado del todo, pues en la fase de convalecencia se siguen presentando síntomas clínicos que dificultan la recuperación normal del individuo.

Agradecimientos

Al personal de salud de las instituciones participantes (Hospital Universitario de Santander, Clínica Chicamocha, Clínica SaludCoop, sedes Conucos y Cañaveral), en especial, a la enfermera Janeth Flórez por su gestión ante el Laboratorio Departamental de Salud para la obtención de

los datos de vigilancia epidemiológica y su colaboración en el desarrollo de las diferentes etapas del estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses.

Financiación

Este estudio fue financiado por el Programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colciencias y por la Universidad Industrial de Santander (modalidad tradicional, código p-2012-1407).

Referencias

1. **Shepard DS, Undurraga EA, Betancourt-Cravioto M, Guzmán MG, Halstead SB, Harris E, et al.** Approaches to refining estimates of global burden and economics of dengue. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e3306. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003306>
2. **Gubler DJ.** Dengue, urbanization and globalization: The unholy trinity of the 21st century. *Trop Med Health*. 2011;39(Suppl.4):S3-11. <http://dx.doi.org/10.2149/tmh.2011-S05>
3. **Organización Panamericana de la Salud.** Plan detallado de acción para la próxima generación: prevención y control del dengue. Programa de enfermedades transmisibles. Washington, D.C.: OPS; 1999. p. 3-13.
4. **Struchiner CJ, Rocklöv J, Wilder-Smith A, Massad E.** Increasing dengue incidence in Singapore over the past 40 years: Population growth, climate and mobility. *PLoS One*. 2015;10:e0136286. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0136286>
5. **Malagón JN, Padilla JC, Rojas-Álvarez DP.** Guía de atención clínica integral del paciente con dengue. *Infectio*. 2011;15:293-301.
6. **Instituto Nacional de Salud.** Rol del Laboratorio Nacional de Referencia en la epidemia de dengue, Colombia 2010. Fecha de consulta: 17 de abril de 2014. Disponible en: <http://190.26.202.205/index.php?idcategoria=86275#>
7. **Instituto Nacional de Salud.** Dengue. Boletín Epidemiológico Semanal. 2015;12:20-1. Fecha de consulta: 17 de abril de 2014. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2015%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2012.pdf>
8. **Padilla JC, Rojas-Álvarez DP, Sáenz-Gómez R.** Dengue en Colombia, epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Primera edición. Bogotá, D.C.; Guías de Impresión Ltda.: 2012. p.142-5.
9. **Murray CJ, López AD.** Quantifying disability: Data, methods and results. *Bull World Health Organ*. 1994;72:481-94.
10. **Suaya JA, Shepard DS, Beatty ME.** Dengue burden of disease and cost of illness. Scientific Working Group: Report on dengue (Vol. TDR/SWG/08), Geneva: WHO; 2007.

11. **Meltzer MI, Rigau-Pérez JG, Clark GG, Reiter P, Gubler DJ.** Using disability-adjusted life years to assess the economic impact of dengue in Puerto Rico: 1984-1994. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59:265-71.
12. **Anderson KB, Chunsuttiwat S, Nisalak A, Mammen MP, Libraty DH, Rothman AL, et al.** Burden of symptomatic dengue infection in children at primary school in Thailand: A prospective study. *Lancet.* 2007;369:1452-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60671-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60671-0)
13. **Tiga-Loza DC, Villar-Centeno LA, Martínez-Vega RA.** Discapacidad en dengue y su relación con severidad. *Salud UIS.* 2011;43:49-55.
14. **Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH.** Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84:200-7. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0503>
15. **Castañeda-Orjuela C, Díaz H, Álvis-Guzmán N, Olarte A, Rodríguez H, Camargo G, et al.** Burden of disease and economic impact of dengue and severe dengue in Colombia, 2011. *Value Heal Reg Issues.* 2012;1:123-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vhri.2012.09.014>
16. **González D, Martínez R, Castro O, Serrano T, Portela D, Vázquez S, et al.** Evaluation of some clinical, humoral and immunological parameters in patients of dengue haemorrhagic fever six months after acute illness. *Dengue Bulletin.* 2005;29:79-84.
17. **López-Barroso R, Deulofeu-Betancourt I, Fayad-Saeta Y, Macías-Navarro MM.** Convalecencia de mujeres que sufrieron dengue serotipo 3 durante el embarazo. *Rev Cuba Med Trop.* 2011;63:206-10.
18. **Seet RC, Quek AM, Lim EC.** Post-infectious fatigue syndrome in dengue infection. *J Clin Virol.* 2007;38:1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2006.10.011>
19. **Chalder T, Berelowitz G, Pawlikowska T, Watts L, Wessely S, Wright D, et al.** Development of a fatigue scale. *J Psychosom Res.* 1993;37:147-53. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-3999\(93\)90081-P](http://dx.doi.org/10.1016/0022-3999(93)90081-P)
20. **Lum LC, Suaya JA, Tan LH, Sah BK, Shepard DS.** Quality of life of dengue patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78:862-7.
21. **Olivares P, Departamento de Estudios y Desarrollo.** Calidad de vida relacionada a la salud (HR-QoL) en población general de Chile 2005. Santiago de Chile: Superintendencia de Salud; 2006. p. 1-24.
22. **Herdman M, Badia X, Berra S.** El EuroQol-5D: una alternativa sencilla para la medición de la calidad de vida relacionada con la salud en atención primaria. *Atención Primaria.* 2001;28:425-9.
23. **Urzúa MA, Caqueo-Úriz A.** Calidad de vida: una revisión teórica del concepto. *Ter Psicol.* 2012;30:61-71. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-48082012000100006>
24. **Kondo K.** Post-infectious fatigue. *JMAJ.* 2006;49:27-33.
25. **Holmes GP, Kaplan JE, Gantz NM, Komaroff AL, Schonberger LB, Straus SE, et al.** Chronic fatigue syndrome: A working case definition. *Ann Intern Med.* 1988;108:387-9. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-108-3-387>
26. **Fukuda K, Straus SE, Hickie I, Sharpe MC, Dobbins JG, Komaroff A.** The chronic fatigue syndrome: A comprehensive approach to its definition and study. *Am Coll Physicians.* 1994;121:953-9. <http://dx.doi.org/doi:10.7326/0003-4819-121-12-199412150-00009>
27. **Organización Panamericana de la Salud.** Dengue: guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control del dengue, 2009. La Paz: OPS/OMS; 2010. Fecha de consulta: 17 de abril de 2014. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789995479213_spa.pdf
28. **Teixeira LD, Lopes JS, Martins AG, Campos FA, Miranzi SD, Nascentes GA.** Persistência dos sintomas de dengue em uma população de Uberaba, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2010;26:624-30. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2010000300019>
29. **García G, González N, Pérez AB, Sierra B, Aguirre E, Rizo D, et al.** Long-term persistence of clinical symptoms in dengue-infected persons and its association with immunological disorders. *Int J Infect Dis.* 2011;15:38-43. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijid.2010.09.008>
30. **Tristão-Sá R, Kubelka CF, Zandonade E, Zagne SM, Rocha N de S, Zagne LO, et al.** Clinical and hepatic evaluation in adult dengue patients: A prospective two-month cohort study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45:675-81. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000600004>
31. **Ayres JG, Flint N, Smith EG, Tunnicliffe WS, Fletcher TJ, Hammond K, et al.** Post-infection fatigue syndrome following Q fever. *QJM.* 1998;91:105-23. <http://dx.doi.org/10.1093/qjmed/91.2.105>
32. **Straus SE, Tosato G, Armstrong G, Lawley T, Preble OT, Henle W, et al.** Persisting illness and fatigue in adults with evidence of Epstein-Barr virus infection. *Ann Intern Med.* 1985;102:7-16. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-102-1-7>
33. **Hickie I, Davenport T, Wakefield D, Vollmer-Conna U, Cameron B, Vernon SD, et al.** Post-infective and chronic fatigue syndromes precipitated by viral and non-viral pathogens: Prospective cohort study. *BMJ.* 2006;333:575. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.38933.585764.AE>
34. **Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG.** Clinical Virology. Third edition. Washington, D.C.: ASM Press; 2009. p. 371-83. <http://dx.doi.org/10.1128/9781555815981>
35. **Halsey ES, Williams M, Laguna-Torres VA, Vilcarrromero S, Ocaña V, Kochel TJ, et al.** Occurrence and correlates of symptom persistence following acute dengue fever in Perú. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90:449-56. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.13-0544>

ARTÍCULO ORIGINAL

Metodología para la elaboración de canales endémicos y tendencia de la notificación del dengue, Valle del Cauca, Colombia, 2009-2013

Mauricio Hernández¹, Diana Arboleda², Stephania Arce², Allan Benavides², Paola Andrea Tejada², Sindy Vanessa Ramírez², Ángela Cubides¹

¹ Grupo de Investigación en Salud Pública, Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia

² Semillero de Investigación, Grupo de Investigación en Salud Pública, Fundación Universitaria San Martín, Cali, Colombia

Introducción. El dengue es la enfermedad de más rápida propagación en el mundo y una permanente amenaza para la salud pública mundial, con aproximadamente 2,5 millones de personas en alto riesgo de infección. Ante la gravedad del cuadro de la enfermedad a nivel nacional y mundial, es necesario generar nuevas metodologías de predicción útiles para la adopción de decisiones en salud pública.

Objetivo. Caracterizar los casos notificados de dengue entre el 2009 y el 2013 en el departamento del Valle del Cauca y presentar la metodología para elaborar canales endémicos en el caso del dengue.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo retrospectivo, utilizando la base de datos secundaria de las fichas de notificación, y se caracterizaron los casos de dengue entre el 2009 y el 2013. Se elaboraron dos canales endémicos, uno mediante promedios móviles y el otro con suavización exponencial.

Resultados. Se evidenció que la tendencia del dengue en el departamento del Valle del Cauca es positiva, lo que indica que en los últimos cinco años se ha incrementado el número de casos, aunque se observa una variación importante que podría explicarse por el ciclo de tres años que se inicia a partir del primer periodo epidemiológico del año.

Conclusión. La elaboración del canal endémico del dengue en el Valle del Cauca evidenció la importancia de aplicar estas metodologías de vigilancia en las situaciones de interés en salud pública. Como se observó en los resultados, hubo años en los que el número de casos fue muy bajo y otros en los que la epidemia alcanzó cifras muy elevadas.

Palabras clave: *Aedes*, virus del dengue, dengue/epidemiología, salud pública, enfermedades endémicas, notificación, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2934>

Methodology to develop endemic channels and notification trends for dengue in Valle del Cauca, Colombia, 2009-2013

Introduction: Dengue is the fastest spreading disease in the world and a permanent threat to global public health. It is a viral illness for which approximately 2.5 million people are at high risk of infection. Given the severity of the disease at national and global levels, new predictive methodologies need to be generated to facilitate decision-making in public health.

Objective: To characterize cases of dengue reported from 2009 to 2013 in Valle del Cauca department, Colombia, and to establish a methodology to develop endemic channels that can be applied to this event.

Materials and methods: This was a retrospective descriptive study. Notification forms were used as a secondary database to characterize dengue cases from 2009 to 2013. Two endemic channels were developed, one using running means and the other through exponential smoothing.

Results: Dengue in the department of Valle del Cauca showed a positive tendency, indicating that the number of cases had increased in the last five years. An important variation was observed that could be explained by a three-year cycle beginning in the first epidemiological period of the year.

Contribución de los autores:

Mauricio Hernández: diseño, gestión y procesamiento estadístico de datos

Diana Arboleda: redacción del manuscrito y consolidación de referencias

Allan Steven Benavides: obtención de la base de datos, tabulación y análisis

Stephania Arce y Sindy Vanesa Ramírez: análisis e interpretación de resultados

Paola Andrea Tejada: escritura de la discusión

Ángela Cubides: revisión crítica del artículo y participación en el análisis

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

Conclusion: The development of the dengue endemic channel for Valle del Cauca illustrates the importance of applying these monitoring methodologies to events of public health interest. As can be seen from the results, there were some years in which the number of cases was very low and others in which the epidemic reached very high levels.

Key words: *Aedes*, dengue virus, dengue/epidemiology, public health, endemic diseases, notice, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2934>

El dengue es una enfermedad viral transmitida principalmente por el vector *Aedes aegypti* (1), que puede evolucionar en forma asintomática o producir síntomas parecidos a los de un proceso febril. Es la principal arbovirosis en términos de morbilidad y mortalidad (2) y se han registrado cuatro serotipos del virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) (3,4). Es la enfermedad de más rápida propagación en el mundo y es una permanente amenaza para la salud pública mundial, con aproximadamente 2,5 millones de personas en alto riesgo de infección (5). El dengue se presenta en climas tropicales y subtropicales de todo el mundo, tanto en zonas semiurbanas como urbanas, y su vector ocupa el mismo hábitat del hombre, ya que es diurno, fundamentalmente antropofílico (6) y su lugar preferido de cría es el agua limpia, casi siempre la almacenada para uso doméstico (7).

Desde hace varios años se reconoce que para lograr el control del dengue, no son suficientes los esfuerzos de las autoridades de salud, sino que es necesario que las comunidades afectadas se apropien de las medidas de control y prevención (8). Por esta razón, la estrategia de movilización y comunicación social para producir cambios de conducta (*Planning Communication for Behavioural Impact*, COMBI) es una de las más promovidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (9). Sin embargo, la implementación de estrategias como esta constituye un desafío que enfrentan actualmente los programas de control de dengue en el país, el cual se ve amenazado por los limitados recursos humanos y económicos con que cuentan y la falta de integración multisectorial, la cual es la base de la estrategia (10,11).

En los últimos 50 años, la incidencia del dengue ha aumentado 30 veces y se estima que anualmente se presentan 40 millones de infecciones, con unas

500.000 hospitalizaciones por dengue hemorrágico o choque por dengue, y que 90 % de los casos se presenta en menores de 15 años (5,12). Según el reporte del Ministerio de Salud titulado "La situación actual del dengue", en el que se analiza el periodo de 2008 a 2013, en la semana 12 del 2013 se detectaron situaciones de epidemia en 32 municipios del país, 18 de los cuales eran capitales de departamento (13,14). El Valle del Cauca es el departamento con más casos de dengue en el país (19,8 %) (2,15); en Cali, la prevalencia de la enfermedad ha aumentado hasta ubicarlo como el municipio con mayor número de casos en Colombia (15,5 % del total nacional) (16,17), lo que se explica, en parte, porque tiene las condiciones necesarias para que el vector se reproduzca adecuadamente.

Las principales condiciones para el control del vector incluyen la voluntad política, el mejoramiento de la infraestructura de salud y de los programas de control del vector, la coordinación intersectorial y una activa participación comunitaria (18,19). Es necesario que la comunidad reconozca su responsabilidad para controlar el vector y que se produzca un cambio de conducta. Se deben fortalecer los planes para combatir los brotes, y los sistemas de vigilancia de las secretarías departamental y municipal de salud, las cuales envían al Sistema de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) las fichas de notificación, pero no llevan a cabo una búsqueda activa de casos (20-22).

Ante la gravedad de la situación de la enfermedad a nivel nacional y mundial, es necesario promover metodologías útiles de seguimiento para la adopción de decisiones en salud pública (7). Por ello, en el presente trabajo se presenta la forma de elaborar canales endémicos mediante dos metodologías reconocidas: la de promedios móviles y la de suavización exponencial, de tal manera que los profesionales encargados en el ámbito de la salud pública puedan implementarlas (23). La herramienta permitirá hacer la vigilancia a partir de límites permitidos de los casos de dengue notificados en el Valle del Cauca desde el 2009 hasta el 2013, incluida la información de Cali, municipio reconocido como el de mayor

Correspondencia:

Mauricio Hernández, Carrera 79B N° 9-18, apartamento C303, Cali, Colombia

Teléfono: (300) 273 3699

mauriciohc@gmail.com

Recibido: 08/07/15; aceptado: 03/12/15

prevalencia de dengue en el país (9,10), con el objetivo de hacer una adecuada planeación e implementar estrategias para el control y la disminución de casos.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio descriptivo y retrospectivo, utilizando una base de datos secundaria de los casos de dengue notificados a la Secretaría Departamental de Salud del Valle del Cauca entre el 2009 y el 2013. Se caracterizaron las principales variables contenidas en la ficha de notificación y se elaboraron dos canales endémicos con diferentes metodologías para describir el comportamiento del dengue en el Valle del Cauca, con lo cual se determinó la línea de tendencia de la enfermedad durante el periodo mencionado.

Plan de análisis

Se describieron las características sociodemográficas de la población afectada por el dengue, teniendo en cuenta las variables contenidas en la ficha de notificación de los casos. Para las características cuantitativas se calculó el promedio y la desviación estándar y para las cualitativas se usaron tablas de frecuencias. El procesamiento de datos y la elaboración de figuras se hicieron en Excel 2010 y el programa R, versión 3.2.1. A continuación se describe paso a paso la elaboración de los canales endémicos.

Elaboración del canal endémico

En la elaboración del canal endémico se utilizó como dato de entrada el número de casos de dengue notificados por semana epidemiológica. El canal endémico es la representación gráfica del número de casos que se presentan en un área en periodos definidos (semana o periodo epidemiológico), comparado con los datos de años anteriores (usualmente, de cinco años).

Existen diferentes métodos para suavizar la tendencia observada y establecer límites de control: el método de promedios móviles, el de suavización exponencial, y métodos más sofisticados como los modelos autorregresivos y la metodología de Box-Jenkins.

En el presente estudio se elaboraron los canales endémicos del dengue mediante las técnicas de promedio móvil y de suavización exponencial, y se definieron los límites de control que permitieran evidenciar el riesgo de epidemia, los cuales se representaron gráficamente así: la zona de éxito, por debajo de la curva inferior; la zona de

seguridad, entre la curva inferior y la media; la zona de alerta, entre la curva media y la superior, y la zona de epidemia, por encima de la curva superior.

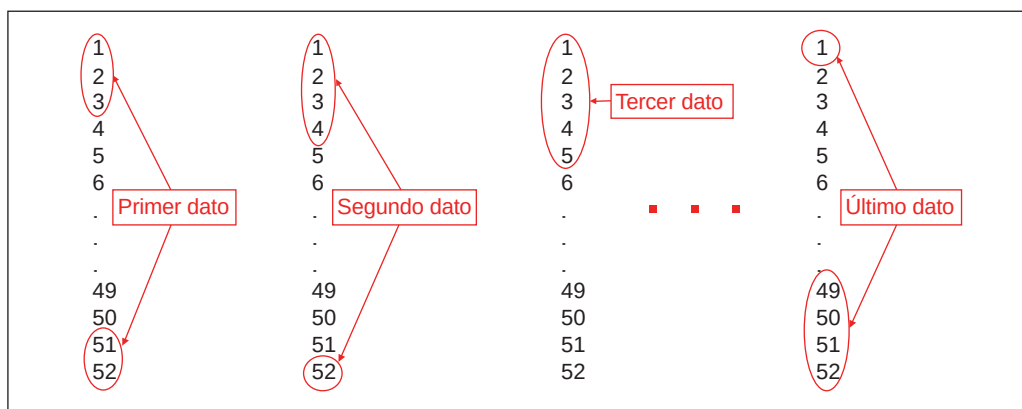
Un valor ubicado en la zona de éxito indica que el número de casos de dengue notificados para esa semana presenta una frecuencia menor de la esperada. Uno ubicado en la zona de seguridad indica que el número de casos de dengue notificados para esa semana presenta un comportamiento estable. Un valor ubicado en la zona de alerta indica que el número de casos de dengue notificados para esa semana presenta una frecuencia que está por encima de lo esperado y es necesario estudiar la situación para determinar si corresponde a un comportamiento aleatorio o está comenzando un periodo epidémico. Un valor ubicado en la zona de epidemia indica que el número de casos de dengue notificados para esa semana presenta una situación que requiere acciones inmediatas de control.

El proceso continúa con la elaboración de un cuadro en el que la semana epidemiológica se pone en las filas y, los años, en las columnas. Esto se hace con base en la frecuencia de un evento (dengue, en este caso) en los cinco años anteriores, por lo que debe disponerse de los casos por semana epidemiológica para cada año.

A continuación, se agrega una columna en la cual se calcula el promedio aritmético de las cinco cifras de cada fila (por semana epidemiológica), para así obtener el promedio de casos por periodo. El factor de corrección se obtiene dividiendo la población estimada para el año en el que se aplica el índice por la población promedio de los cinco años anteriores. La columna siguiente es el valor esperado de casos por periodo (Y), el cual se obtiene multiplicando el promedio de casos de cada periodo por el factor de corrección. Cuando se grafica este valor esperado se obtiene una línea irregular, por lo tanto, deben calcularse los promedios móviles o datos suavizados exponencialmente para cada periodo. La columna siguiente es el promedio móvil (Y1) o el dato suavizado exponencialmente (S1), según sea el caso. El promedio móvil (Y1) se obtiene con el promedio aritmético de los periodos 1, 2, 3, 51 y 52 para el primer dato; de los periodos 1, 2, 3, 4 y 52, para el segundo dato; de los periodos 1, 2, 3, 4, y 5, para el tercer dato, y así sucesivamente; el último dato se obtiene con el promedio de los valores de los periodos 1, 2, 50, 51 y 52. Debe recordarse que el periodo corresponde a una semana epidemiológica (cuadro 1, figura 1).

Cuadro 1. Cálculo del canal endémico

Semana	Casos observados en el quinquenio						Casos esperados		Límites permisibles					
	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Promedio	Factor de corrección	Promedio esperado	Promedio suavizado	Cálculo del error		Cálculo de límites		
								Y	Y ₁ - S ₁	(Y - Y ₁)	(Y - Y ₁) ²	(Y ₁ - 2S)	(Y ₁ + 2S)	
1														
2														
.														
.														
.														
51														
52														
Total											Suma			

**Figura 1.** Cálculo de promedios móviles para elaborar el canal endémico

El dato suavizado exponencialmente (S_1) se obtiene de la siguiente manera: primero, se establece una constante de suavización, la cual depende del grado de suavización que se desee; entre menor sea, menos alteraciones se generan. Lo contrario sucede si está próximo a 1, ya que no se encontrarán grandes diferencias con respecto a la curva de valores esperados (Y).

Una vez establecida dicha constante, se procede a hallar los datos suavizados de la siguiente forma:

$S_1 = Y(1)$, valor esperado del primer período

$S_2 = (Y(2) + (1 - \alpha) S_1)$

$S_3 = (Y(3) + (1 - \alpha) S_2)$

$S_t = (Y(t) + (1 - \alpha) S_{t-1})$

Los valores de los promedios móviles o datos suavizados exponencialmente se colocan en un plano cartesiano de dos ejes (X , Y) y dan origen al canal endémico del dengue.

A la curva endémica obtenida se le fijan límites permisibles con base en el error estándar de las estimaciones y la siguiente fórmula:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (Y - Y_1)^2}{n}} \quad \text{o} \quad S = \sqrt{\frac{\sum (Y - S_1)^2}{n}}$$

Los límites superior e inferior del canal endémico se calculan en dos columnas adicionales de la siguiente manera.

Límite inferior igual a $(Y_1 - 2s)$ o $(S_1 - 2s)$

Límite superior igual a $(Y_1 + 2s)$ o $(S_1 + 2s)$

Para seleccionar la constante de suavización exponencial fue necesario hacer varias pruebas, de modo que la constante seleccionada no perturbara mucho la información original.

Mientras que el método de promedios móviles se ve afectado por datos extremos, el método de suavización exponencial es adecuado en aquellos casos en los que el comportamiento de

los datos no tiene una tendencia ascendente o descendente. Este método se basa en suavizar los valores de una serie de manera exponencial decreciente, aplicando una constante α ($0 < \alpha < 1$); la observación más reciente recibe el peso α , la siguiente $\alpha(1-\alpha)$; luego $\alpha(1-\alpha)^2$, y así sucesivamente. Los resultados dependen del valor de α , y se recomienda que este valor se encuentre entre 0,01 y 0,30, ya que si es superior a 0,30 se generan cambios sensibles en las fluctuaciones y, si es muy pequeño, se genera el efecto contrario y las curvas generadas no responderán adecuadamente a los cambios en los datos. Se pueden utilizar valores distintos a α dependiendo de la variación de los valores históricos empleados. Por ejemplo, si los datos son muy estables, se podría utilizar un valor de α bajo. Estos valores dependerán de la experiencia del analista y de su conocimiento sobre el comportamiento de los datos.

En este caso, para elegir la constante de suavización exponencial fue necesario hacer varias pruebas, de modo que la constante seleccionada no perturbara la información original, para lo cual se utilizaron diferentes constantes de suavización entre 0,01 y 0,30, y se escogió la constante $\alpha=0,28$.

Consideraciones éticas

La investigación se rigió por lo establecido en la Resolución 8430 de 1993, del Ministerio de Salud de Colombia, según la cual se trata de una investigación sin riesgo en la cual se usó una base de datos secundaria. Se contó con el aval del Comité de Ética de la Fundación Universitaria San Martín (Cali) y con autorización de la Secretaría Departamental de Salud del Valle.

Resultados

Durante el periodo comprendido entre el 2009 y el 2013, hubo mayor incidencia de casos de infección por el virus del dengue en los hombres que en las mujeres; los años de mayor incidencia fueron

el 2010 y el 2013 y, en este último, se presentó la mayoría de los casos reportados en el periodo de estudio; en el 2011 y el 2012, por el contrario, hubo una disminución drástica en el número de casos (cuadro 2 y figura 2).

Se observó un predominio de casos en los hombres, con 53,23 %, mientras que en las mujeres fue de 46,77 %. La mayoría de los pacientes reportados mediante ficha de notificación no fueron hospitalizados. La condición final reveló que tres pacientes murieron a causa de la enfermedad en el 2009, el 2010 y el 2012.

La mayoría de los casos se presentó en la cabecera municipal (91,23 %), seguida de los centros poblados (6,06 %) y de las áreas rurales dispersas (2,71 %). La mayoría de los pacientes (93,54 %) afectados por el virus del dengue no se había desplazado en los cinco días anteriores al inicio de los síntomas y en el momento de aparición de la infección la mayoría de ellos no convivía con personas con síntomas indicativos de la enfermedad (48,41 %) (cuadro 3).

En cuanto a la edad, se encontró que el mayor número de pacientes tenía entre 10 y 14 años, cifra que descendió al aumentar la edad. Sin embargo, se evidenció un incremento de casos en menores de cinco años en el 2011 (figura 3).

Entre los municipios de residencia señalados en las fichas de notificación, Palmira (6,91 %), Cartago (4,74 %), Buga (3,33 %), Tuluá (2,90 %), Yumbo (2,56 %) y Florida (1,70 %) presentaron una alta tasa de casos de infección por *A. aegypti*; sin embargo, en el municipio de Cali (63,39 %) se registró la mayoría de casos en el periodo de estudio. Los municipios de Alcalá (0,15 %), El Águila (0,05 %), El Cairo (0,03 %), El Dovio (0,01 %), La Cumbre (0,02 %), Obando (0,13 %), Restrepo (0,07 %), Ulloa (0,03 %) y Versalles (0,04 %) presentaron el menor número de casos de dengue notificados en

Cuadro 2. Distribución de la edad según sexo y año de aparición de los casos de dengue, Valle del Cauca, 2009 a 2013

Año de aparición	Sexo femenino			Sexo masculino			Total		
	n	Promedio	DE	n	Promedio	DE	n	Promedio	DE
2009	5.103	22,8	18,7	5.583	22,1	17,6	10.686	22,4	18,1
2010	9.760	24,8	20,2	10.461	23,8	18,7	20.221	24,3	19,5
2011	1.456	29	22,8	2.020	27,5	19,9	3.476	28,2	21,2
2012	1.737	26,8	21,7	2.376	24,8	18,7	4.113	25,7	20,1
2013	11.715	27,1	19,8	13.444	25,7	18,7	25.159	26,3	19,2
Total	29.771	25,7	20,1	33.884	24,5	18,7	63.655	25,1	19,4

DE: desviación estándar

el periodo de estudio y, aunque el menor número de casos se presentó en el municipio de El Dovio (0,01 %), no se descarta que haya sesgos en el estudio debido a deficiencias en la oportunidad y la exactitud de la notificación, además del hecho de que algunos habitantes afectados con el virus podrían no haber tenido acceso a servicios de salud, lo cual afectaría las estadísticas (cuadros 4 y 5).

Los canales endémicos elaborados por semana epidemiológica mostraron que el comportamiento del dengue tuvo una tendencia ascendente en las primeras semanas epidemiológicas, hasta llegar a un pico en la semana 8, cuando se registró una media alrededor de los 300 casos, en tanto que al llegar a la semana 29 se presentó una disminución (figura 4).

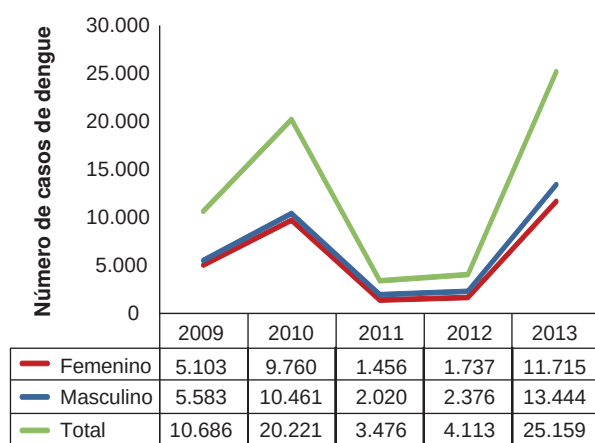


Figura 2. Distribución del número de casos de dengue según sexo y año de aparición, Valle del Cauca, 2009 a 2013

Discusión

El comportamiento del dengue durante los años estudiados tuvo una tendencia positiva, con un incremento en el número de casos en 2013. Sin embargo, en el 2010 y el 2011 el número de casos fue muy bajo con respecto a los demás años, lo cual indica que la capacidad de transmisión estaría relacionada con un ciclo de tres años, patrón que habría que investigar en futuros estudios sobre el dengue. Los factores de riesgo de la infección no se establecieron por sexo, pues la probabilidad de enfermar en hombres y mujeres es igual, aunque a la luz de los resultados del presente estudio hubo una mayor tendencia de infección en hombres que en mujeres; se podría concluir, entonces, que el sexo masculino es más propenso al contagio, seguramente porque los hombres tienen mayor probabilidad de contacto con el vector debido a que son quienes usualmente trabajan y deben desplazarse más que las mujeres.

En el grupo entre los 10 y los 14 años de edad se presentó el mayor número de casos; sin embargo, en el 2011 se registró un cambio evidente, pues los casos predominaron en los menores de cinco años; un estudio en Tailandia describe el virus del dengue como el principal entre niños de uno a 15 años de edad (24), lo cual concuerda con los resultados del presente estudio y evidencia la aparición de un número importante de casos de infección en edades pediátricas y en la adolescencia.

Las epidemias de dengue tienen una tendencia ascendente y afectan en mayor proporción a los menores de 15 años, lo cual daría pie a la

Cuadro 3. Distribución según tipo de variable de la ficha de notificación y año de aparición de los casos de dengue, Valle del Cauca, 2009 a 2013

Variable	Categoría	2009 n=10.686	2010 n=20.221	2011 n=3.476	2012 n=4.113	2013 n=25.159	Porcentaje total
Sexo	Femenino	5.103	9.760	1.456	1.737	11.715	46,77
	Masculino	5.583	10.461	2.020	2.376	13.444	53,23
Paciente hospitalizado	No	7.419	15.138	2.631	2.879	19.289	74,39
	Sí	3.267	5.083	845	1.234	5.870	25,61
Condición final	Muerto	1	1		1		0,00
	Vivo	10.685	20.220	3.476	4.112	25.159	100,00
Área de aparición del caso	Cabecera municipal	9.745	17.609	3.110	3.708	23.899	91,23
	Centro poblado	646	1.881	242	256	832	6,06
	Zona rural dispersa	295	731	124	149	428	2,71
¿Desplazamiento en los últimos cinco días?	No	10.168	19.049	3.104	3.721	23.503	93,54
	Sí	412	836	334	357	1.539	5,46
	Sin datos	106	336	38	35	117	0,99
¿Algún familiar o conviviente ha tenido síntomas de dengue en los últimos 15 días?	No se sabe	2	872	596	470	1.979	6,16
	No	2	3.249	2.677	3.373	21.512	48,41
	Sí		233	160	235	1.551	3,42
	Sin datos	10.682	15.867	43	35	117	42,01

hipótesis de que en estas edades los individuos están más en contacto con el medio ambiente y ello podría contribuir a una mayor posibilidad de infección, además de las condiciones precarias en que vive la mayoría de la población (25). Se ha reportado una estrecha relación entre el dengue y los cambios climáticos globales (en el 2010, la temperatura promedio en Cali fue de 24,6 °C y, en el 2013, de 25 °C); el incremento en los casos de dengue se ha asociado con el fenómeno de El Niño, el cual se caracteriza por grandes sequías y un aumento de la temperatura en todo el territorio

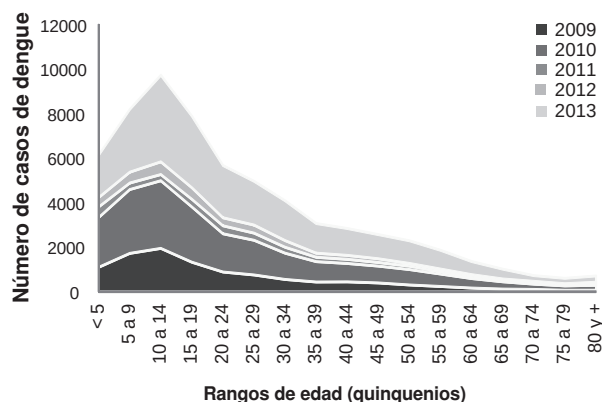


Figura 3. Distribución del número de casos de dengue según rangos de edad (quinquenos) y año de aparición, Valle del Cauca, 2009 a 2013

(26). En consecuencia, los habitantes recurren al almacenamiento de agua, casi siempre de forma inapropiada. De igual manera, en temperaturas más cálidas el tamaño de las larvas de *A. aegypti* se reduce y, por ende, el tamaño del adulto y, como se sabe, los adultos más pequeños tienen que alimentarse con más frecuencia para desarrollar un lote de huevos, lo que aumenta la frecuencia de picaduras y, con ello, la transmisión del virus (27).

La mayoría de los pacientes afectados por el virus del dengue no se desplazaron en los cinco días previos al inicio de los síntomas y, en el momento de aparición de la infección, la mayoría de ellos no convivía con personas que presentaran síntomas indicativos de la enfermedad. Esto nos lleva a concluir que el departamento del Valle del Cauca es una zona endémica para la infección por el virus del dengue, lo cual la convierte en una enfermedad de interés en salud pública de alto impacto, en cuya aparición influyen múltiples factores, entre ellos, las condiciones favorables para los criaderos del mosquito, la falta de concientización sobre la enfermedad entre los habitantes, la aparición de ciclos epidémicos cada vez más cortos, la circulación simultánea de los cuatro serotipos y, además, la infestación por *A. aegypti* del territorio situado por debajo de los 1.800 metros sobre el nivel del mar.

Cuadro 4. Distribución según departamento de residencia y año de aparición de los casos de dengue

Departamento de residencia	2009 n=10.686	2010 n=20.221	2011 n=3.476	2012 n=4.113	2013 n=25.159	Total	Porcentaje total
Valle	10.549	19.873	3.462	4.092	25.081	63.057	99,06
Otros	137	348	14	21	78	598	0,94

Cuadro 5. Distribución según municipio de residencia en el Valle del Cauca y año de aparición de los casos de dengue, 2009 a 2013

Municipio	2009 n=10.686	2010 n=20.221	2011 n=3.476	2012 n=4.113	2013 n=25.159	Porcentaje total	Población del Valle 2013	Tasa x 1.000 habitantes 2013
Cali	5.899	11.058	1.737	2.571	18.707	63,39	2'319.655	8
Palmira	1.966	1.166	270	195	763	6,91	300.712	3
Cartago	137	1.091	244	133	1.386	4,74	130.827	11
Buga	237	1.037	180	177	471	3,33	115.613	4
Tuluá	302	513	173	201	641	2,90	206.588	3
Yumbo	233	563	83	144	590	2,56	111.707	5
Florida	220	295	58	44	455	1,70	57.697	8
Candelaria	141	341	38	36	325	1,40	79.279	4
La Unión	154	291	169	87	98	1,27	36.444	3
Pradera	270	193	24	48	164	1,11	53.792	3
Buenaventura	60	308	76	82	149	1,07	384.402	0
Otros municipios <1 %	930	3.017	410	374	1.332	9,62	723.450	2
Total	10.549	19.873	3.462	4.092	25.081	100,00	4'520.166	6

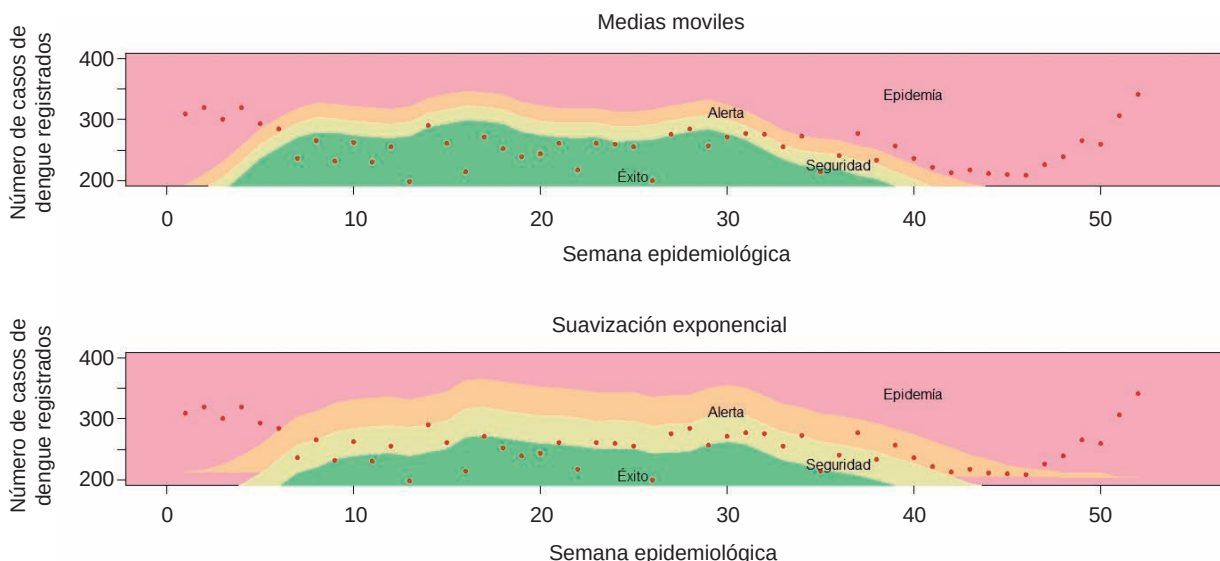


Figura 4. Canales endémicos del dengue por semana epidemiológica en el Valle del Cauca de 2009 a 2013, elaborados mediante los métodos de promedios móviles y de suavización exponencial

En un artículo sobre dengue y dengue hemorrágico en las Américas (20), se hace énfasis en lo establecido por la OMS para el control y la prevención del dengue, especialmente en los planes dirigidos a lograr la adecuada manipulación y limpieza de los contenedores domésticos de agua, y el aumento de la capacidad de reconocimiento de la enfermedad por parte del personal médico, de los mismos pacientes y de la comunidad. Según los resultados preliminares disponibles, estos planes han contribuido a fortalecer los programas nacionales (28). Sin embargo, los resultados de la curva epidemiológica del Valle del Cauca durante estos últimos años contradicen la orientación de esta metodología, lo cual exige indagar sobre nuevos métodos de control sanitario y de prevención de la propagación del dengue teniendo en cuenta las zonas tropicales de mayor incidencia (26,29). Las intervenciones de prevención de la infección por el virus no deben ser solamente epidemiológicas, pues se necesita la ayuda de todos los sectores involucrados (30). El control del dengue es más que la utilización de insecticidas o campañas de limpieza, incluye la modificación de factores sociales y culturales que favorecen la transmisión. Estos factores predominan en el ámbito familiar, pues están en estrecha relación con las formas de vida de cada hogar. En este sentido se ha constatado que el principal factor determinante del crecimiento del vector *A. aegypti* es la manera inadecuada de manejar las aguas estancadas, así que, si se logra establecer hábitos

adecuados en cada hogar, se podría disminuir la presencia de la enfermedad notoriamente en la cabecera municipal, así como la morbilidad que produce (22,31).

Puede haber un subregistro importante de dengue, pues es posible que algunos casos no se hayan notificado porque los pacientes no acudieron a las instituciones prestadoras de servicios de salud, las cuales son las encargadas de notificar al Sivigila, o porque la condición no se configuró como caso.

Los canales endémicos se elaboraron con dos métodos, el de promedios móviles y el de suavización exponencial. El primero está influenciado por datos extremos y el segundo requiere el uso de diferentes valores de alfa hasta encontrar el adecuado. No se tuvieron en cuenta otros métodos, como el de la media geométrica o el de los cuantiles.

Agradecimientos

A la Secretaría de Salud Departamental del Valle, por autorizar el uso de la base de datos y promover investigaciones que permitan conocer la dinámica de enfermedades de gran impacto en salud pública como el dengue, y al área de investigación de la Facultad de Medicina de la Fundación Universitaria San Martín – Cali, por brindarnos los conocimientos necesarios para escribir este artículo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses con respecto al presente manuscrito.

Financiación

La investigación se hizo con recursos propios de los investigadores.

Referencias

1. **Fonseca I, Quiñones ML, Lenhart A, Brogdon WG.** Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Manag Sci.* 2011;67:430-7. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.2081>
2. **Rodríguez JM, Ortiz Y, Rodríguez RF.** Epidemiología del dengue en Palmira, Valle, Colombia, 2001-2004. *Revista de la Facultad de Medicina.* 2014;54:88-95.
3. **Velandia ML, Castellanos JE.** Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio.* 2011;15:33-43.
4. **Ocazonez RE, Ortiz AS, Gómez SY, Miranda DR.** Virus del dengue de serotipo 1 (DENV-1) de Colombia: su contribución a la presentación del dengue en el departamento de Santander. *Biomédica.* 2013;33:22-30. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.717>
5. **Zambrano P, Mercado M.** Vigilancia y análisis del riesgo en salud pública. Protocolo de vigilancia en salud pública del dengue 2011. Fecha de consulta: 22 de junio 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Dengue.pdf>
6. **Hernández PA.** Aporte a la enseñanza de la epidemiología de las enfermedades transmisibles en Cuba, 2009. Fecha de consulta: 18 de junio 2015. Disponible en: http://tesis.repo.sld.cu/94/1/Pedro_Rodr%C3%ADguez.pdf
7. **Rodríguez J, Prieto S, Correa C, Arnold Y, Álvarez L, Bernal P, et al.** Dinámica de la epidemia del dengue en Colombia: predicciones de la trayectoria de la epidemia. *Revista Med.* 2013;21:38-45.
8. **Carabalí M, Ocampo CB, Toledo ME, Osorio L.** Difusión masiva de reportes situacionales sobre dengue: efectos de la intervención en Guadalajara de Buga, Colombia. *Biomédica.* 2013;33:130-41. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.724>
9. **Parks W, Lloyd L.** Planificación de la movilización y comunicación social para la prevención y el control del dengue 2004. Fecha de consulta: 26 de junio 2015. Disponible en: http://cdrwww.who.int/entity/tdr/publications/documents/planificacion_dengue.pdf
10. **Cáceres-Manrique FdeM, Vesga-Gómez C, Angulo-Silva ML.** Empoderamiento para la prevención y control del dengue. *Rev Salud Pública.* 2010;12:798-806. <http://dx.doi.org/10.1590/S0124-00642010000500010>
11. **González AL, Martínez RA, Villar LA.** Evolución clínica de pacientes hospitalizados por dengue en una institución de salud de Bucaramanga, Colombia. *Biomédica.* 2008;28:531-43. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v28i4.58>
12. **González A, Ibarra AM.** Nivel de conocimientos, actitudes y prácticas sobre la prevención del mosquito *Aedes aegypti* en comunidades del municipio Diez de Octubre, La Habana. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 2011;49:247-59.
13. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Situación actual del dengue a semana 12 de 2013, periodo de análisis : 2008-2013. Fecha de consulta: 10 de mayo 2015. Disponible en: <http://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/INFORME%20SITUACION%20DE%20DENGUE.pdf>
14. **Restrepo BN, Piedrahita LD, Agudelo IY, Marín K, Ramírez R.** Infección por dengue: una causa frecuente de síndrome febril en pacientes de Quibdó, Chocó, Colombia. *Biomédica.* 2014;35:131-7. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2345>
15. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Dengue 2015. Fecha de consulta: 1 de junio 2015. Disponible en: <http://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PET/Paginas/dengue.aspx>
16. **Wilder A, Ooi E, Vasudevan SG, Gubler DJ.** Update on dengue: Epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. *Curr Infect Dis Rep.* 2010; 2:157-64. <http://dx.doi.org/10.1007/s11908-010-0102-7>
17. **Rúa GL, Suárez CdelR, Rojo RA.** Implicaciones epidemiológicas de *Aedes albopictus* (Skuse) en Colombia. *Rev Fac Nac Salud Pública.* 2012;30:328-37.
18. **Peláez O, Sánchez L, Mas-Bermejo P, Pérez S, Kourí G, Guzmán MG.** Prevalencia de síndromes febriles en la vigilancia del dengue: Ciudad de La Habana, 2007. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 2010;48:1-14.
19. **Caldera S, Jaramillo S, Cochero S, Pérez A, Bejarano E.** Diferencias genéticas entre poblaciones de *Aedes aegypti* de municipios del norte de Colombia, con baja y alta incidencia de dengue. *Biomédica.* 2013;33:89-98. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.1573>
20. **Periago MR, Guzmán MG.** Dengue y dengue hemorrágico en las Américas. *Rev Panam Salud Pública.* 2007;21:187-91. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892007000300001>
21. **Clark GG, Rubio Y.** Mosquito vector biology and control in Latin America - a 22nd Symposium. *J Am Mosq Control Assoc.* 2012;28:102-10. <http://dx.doi.org/10.2987/12-6253.1>
22. **Ocampo CB, González C, Morales CA, Pérez M, Wesson D, Apperson CS.** Evaluation of community-based strategies for *Aedes aegypti* control inside houses. *Biomédica.* 2009; 29:282-97. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v29i2.30>
23. **Guzmán A, Istúriz RE.** Update on the global spread of dengue. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36:S40-2. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.018>
24. **Acosta HF, Bayona MA, Zabaleta TE, Villar LA, Narváez CF, Rodríguez JA, et al.** Compromiso hepático por dengue en niños del Huila, Colombia. *Rev Salud Pública.* 2012;14:982-92.
25. **Instituto Nacional de Salud, Ministerio de la Protección Social, Organización Panamericana de la Salud.** Protocolo para la vigilancia en salud pública del dengue. Fecha de consulta: 11 de abril 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Dengue/01%20Protocolo%20Dengue.pdf>
26. **Rúa GL, Suárez C, Chauca J, Ventosilla P, Almanza R.** Modelado del efecto de la variabilidad climática local sobre la transmisión de dengue en Medellín (Colombia) mediante análisis de series temporales. *Biomédica.* 2013;33:142-52. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.1444>
27. **Instituto Nacional de Salud, Ministerio de la Protección Social, Organización Panamericana de la Salud.** Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión

- de dengue 2015. Fecha de consulta: 20 de junio 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/dengue/03%20vigilancia%20entomo%20dengue.pdf>
28. **Guzmán MG.** El dengue y el dengue hemorrágico ¿una entidad olvidada? *Rev Cubana Med Trop.* 2002;54:169-70.
 29. **Constanza L, Quintero J, García T, González C, Fuentes M.** Funcionamiento de las políticas gubernamentales para la prevención y el control del dengue: el caso de Arauca y Armenia en Colombia. *Biomédica.* 2015;35:186-95. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2332>
 30. **Departamento Administrativo de Planeación de Santiago de Cali.** Cali en cifras 2011. Fecha de consulta: 22 de junio 2015. Disponible en: http://planeacion.cali.gov.co/Publicaciones/Cali_en_Cifras/Caliencifras2011.pdf
 31. **Moreira I, Gámez D.** Características clínicas epidemiológicas de los cooperantes con dengue en el municipio Torres, estado de Lara, Venezuela, 2008. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 2012;50:179-88.

ARTÍCULO ORIGINAL

Seroprevalencia del virus linfotrópico humano de tipos I y II en donantes del Banco de Sangre de la Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia, 2008-2014

Carmenza Macía¹, Sandra Vargas¹, Ana María Mora², Ashly Melissa Sarmiento², Robinson Pacheco³, Fernando Rosso³

¹ Banco de Sangre Fundación y Servicio Transfusional (sic), Clínica Valle del Lili, Cali, Colombia

² Facultad de Medicina, Universidad ICESI, Cali, Colombia

³ Centro de Investigaciones Clínicas, Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia

Introducción. El virus linfotrópico humano (HTLV) de tipos I y II es un retrovirus prevalente en la Costa Pacífica colombiana que puede transmitirse por transfusiones de sangre. En el 2014 se reglamentó la tamización para bancos de sangre con el fin de reducir la transmisión por medio de la donación. La información sobre la seroprevalencia del virus en el suroccidente colombiano es limitada.

Objetivo. Determinar la seroprevalencia, el comportamiento a lo largo del tiempo de los resultados reactivos antes y después de la introducción del inmunoensayo *Western blot* y la concomitancia del HTLV con otros marcadores de infección en donantes de un banco de sangre de Cali, Colombia.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio transversal de 77.117 donantes del Banco de Sangre de la Fundación Valle del Lili mediante el análisis de los registros de donantes con prueba reactiva para anticuerpos IgG anti HTLV I-II entre enero de 2008 y diciembre de 2014.

Resultados. La seroprevalencia acumulada fue de 0,24 %. Los resultados reactivos fueron más frecuentes en mujeres (61 %) y la mediana de edad fue de 37 años. La seroprevalencia en los años previos a la introducción del *Western blot* fue de 0,13, 0,19, 0,31 y 0,32 % (2008-2012), y posteriormente fue de 0,18, 0,08 y 0,07 % (2012-2014). La reacción positiva concomitante con otros marcadores de infección fue de 11 %: sífilis (57 %), HIV (19 %), hepatitis B (14 %) y hepatitis C (9 %). La mayor seroprevalencia (0,38 %) se registró en el 2012.

Conclusión. Se encontró una alta prevalencia de pruebas reactivas para el HTLV I-II en comparación con otros estudios. Los resultados de este estudio son un punto de partida para el desarrollo de estudios poblacionales.

Palabras clave: anticuerpos anti-HTLV-I, anticuerpos anti-HTLV-II, donantes de sangre, prevalencia, serología, *Western blotting*.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2942>

Seroprevalence of human T-lymphotropic virus in blood bank donors at Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia, 2008-2014

Introduction: Human lymphotropic virus (HTLV I/II) is a retrovirus that is prevalent across the Colombian Pacific coast, and is potentially transmissible by transfusion. Blood bank screening has been regulated since 2004, in order to reduce transmission of HTLV I/II through donation. Information on the seroprevalence of the virus in southwestern Colombia is limited.

Objective: To determine the seroprevalence and the behavior of reactivity to HTLV I/II before and after the introduction of *Western blot*, and the comorbidity of HTLV and other infectious markers in donors from a blood bank in Cali, Colombia.

Materials and methods: We conducted a cross-sectional study of 77,117 blood bank donors from the *Fundación Valle del Lili* by analyzing records of donors who had been tested with the reactive test for anti-HTLV I-II antibodies (IgG) between January, 2008, and December, 2014.

Results: The cumulative seroprevalence during the study period was 0.24% (186/77,119). Reactivity was more common in women (61%), and the median age was 37 years (IQR: 24-48). The seroprevalence in the years before the introduction of *Western blot* was 0.13%, 0.19%, 0.31%, 0.32% and 0.18% (2008-

Contribución de los autores:

Robinson Pacheco y Fernando Rosso: desarrollo de la idea, diseño del estudio y revisión crítica del contenido

Carmenza Macía y Sandra Vargas: implementación de las pruebas de tamización y confirmatorias, creación de la base de datos, análisis de la información y revisión crítica del contenido

Ana María Mora y Ashly Melissa Sarmiento: desarrollo de la idea, revisión de la literatura, diseño del estudio y análisis de la información
Todos los autores participaron en la redacción del manuscrito.

2012), and thereafter it was 0.08% and 0.07% (2012-2014). Concomitant reactivity with other infectious markers was 11%: syphilis (57%), followed by HIV (19%), hepatitis B (14%) and hepatitis C (9%). The highest seroprevalence (0.38%) was reported in 2012.

Conclusion: We found a high prevalence of reactivity to HTLV I-II compared to that reported in other studies. The results of this study are a starting point for the development of population studies.

Key words: HTLV-I antibodies; HTLV-II antibodies; blood donors; prevalence; serology; blotting, Western.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2942>

El virus linfotrópico de células T humanas (*Human T-cell Lymphotropic Virus*, HTLV) pertenece a la familia Retroviridae, subfamilia Oncovirinae y al grupo de los virus linfotrópicos de primates (PTLV) (1). Se conocen cuatro subtipos (HTLV I-IV) y solo los subtipos HTLV I y II se han relacionado con el desarrollo de enfermedades en humanos (2-4). El HTLV-1 es un retrovirus intracelular cuyo blanco principal son los linfocitos T. La concentración de formas libres del virus en plasma es sumamente baja, por lo cual la transmisión se da a partir del contacto con linfocitos infectados (5). El virus se puede adquirir por diferentes vías: vertical (madre-hijo), contacto sexual y vía parenteral por transfusión sanguínea o uso de inyecciones e instrumentos de aplicación de medicamentos parenterales (6). El riesgo de adquirir la infección varía dependiendo de la vía de contagio. La vía más efectiva de transmisión es la endovenosa, especialmente la transfusión de glóbulos rojos, seguida de la transmisión por la lactancia, con una eficiencia de 20 %, y, por último, la vía intrauterina y durante el parto, con 5 % (7).

Son diversas las enfermedades relacionadas con la infección por HTLV I-II, pero solo entre el 5 y el 10 % de las infecciones progresan a enfermedad (7). Entre las descritas hasta el momento figuran la leucemia o linfoma de células T, la paraparesia espástica tropical o miopatía asociada al HTLV, la uveítis, múltiples alteraciones dermatológicas, la miositis, la polimiositis, la polineuropatía, los trastornos psiquiátricos, las infecciones oportunistas, la infección por *Strongyloides stercoralis* y las condiciones reumatológicas autoinmunitarias (8-10). Se ha reportado la asociación entre el desarrollo de un tipo específico de enfermedad y la vía de transmisión del virus. Fujino, *et al.*,

concluyeron que el riesgo de desarrollar leucemia o linfoma de células T por infección con el HTLV es mayor cuando el virus se adquiere a través de la leche materna (11); Osame, *et al.*, demostraron que existía un mayor riesgo para el desarrollo de paraparesia espástica tropical o miopatía asociada al HTLV en pacientes que habían adquirido el virus por transfusión sanguínea (12). La infección simultánea con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) se presenta con frecuencia en áreas urbanas de Europa y África, donde se ha encontrado con mayor frecuencia en pacientes que tienen linfoma de células T con complicaciones neurológicas, por lo cual se los considera en riesgo de complicaciones de mayor gravedad (13).

El HTLV es un virus de distribución mundial, y se estima que 20 millones de personas están infectadas con él. Los países reportados como endémicos son Japón, países del centro y occidente de África, de Latinoamérica y de las islas del Caribe. Algunos estudios realizados en Suramérica reportan que la prevalencia del virus puede oscilar entre 0,05 y 7 % (14-16).

En Colombia se han hecho pocos estudios sobre la prevalencia, la carga de las enfermedades y la dinámica de la transmisión del virus. En dos estudios poblaciones en Tumaco, Nariño, en 1988, y en Puerto Tejada, Cauca, en 1997, se reportaron prevalencias de 7 y 3 %, respectivamente (17,18). En otros estudios llevados a cabo en bancos de sangre del país se ha reportado que la seroprevalencia del virus en donantes puede oscilar entre 0,07 y 3,52 % (19-21). Los datos adicionales reportados por la Red Nacional de Bancos de Sangre para el 2013 dan cuenta de una seroprevalencia de 0,21 %, similar a la reportada para el HIV, la cual fue de 0,23 % (22).

A partir de 2014 es obligatorio para los bancos de sangre colombianos hacer pruebas de anticuerpos para los subtipos HTLV I y II en los donantes (23); sin embargo, en el Banco de Sangre de la Fundación Valle del Lili estas pruebas se vienen haciendo desde 1996, y a partir de 2012 se introdujo el *Western blot* como prueba confirmatoria.

Correspondencia:

Sandra Vargas, Banco de Sangre Fundación y Servicio Transfusional (sic), Clínica Valle del Lili, Avenida Simón Bolívar, Carrera 98 N° 98-49, Santiago de Cali, Colombia
Teléfono: (572) 331 9090; extensiones 3248 y 3016
svargas@fcvl.org

Recibido: 30/06/15; aceptado: 10/02/16

En este estudio se evaluaron los resultados de la tamización para el HTLV I y II en muestras de donantes de sangre en el periodo comprendido entre enero de 2008 y diciembre de 2014, con el objetivo de determinar la seroprevalencia de la respuesta reactiva al HTLV, evaluar su comportamiento temporal con la prueba de tamización utilizada y determinar la doble reacción frente a otros marcadores de infección en donantes del banco de sangre de la Fundación.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio descriptivo de corte transversal en el banco de sangre de la Fundación. Se analizaron todos los registros de donantes de cualquier componente sanguíneo con prueba reactiva para anticuerpos IgG anti HTLV I-II, durante el periodo de 2008 a 2014.

Todos los donantes del banco de sangre de la Fundación son voluntarios. La captación de donantes se hace mediante diferentes estrategias y en diversos lugares (universidades, empresas, colegios y en la sede principal de la Fundación Valle del Lili). Todos los posibles donantes contestan un cuestionario del banco de sangre y se excluyen aquellos considerados de alto riesgo o quienes se rehúsan a la donación. Todas las unidades de sangre obtenidas se someten a tamización para HTLV I-II, enfermedad de Chagas, HIV I-II, sífilis, y virus de las hepatitis C y B (core HBsAg).

Las unidades de sangre del estudio se tamizaron para la detección de HTLV I y II con el método de inmunoensayo de quimioluminiscencia de micropartículas (CMIA), el cual se analizó mediante la plataforma automatizada Architect System (Abbott®). A las muestras reactivas se les repitió la prueba de tamización dos veces y a las que fueron doblemente reactivas se les hizo la prueba confirmatoria mediante *Western blot* (MP Diagnostic HTLV BLOT 2.4). Ambas pruebas se hicieron siguiendo las especificaciones de los fabricantes y estuvieron a cargo de profesionales en bacteriología debidamente entrenados y certificados por *Abbott Diagnostic Division*.

Se contactó a todos los donantes con resultados confirmados mediante *Western blot* para ofrecerles asesoría y canalizarlos hacia la aseguradora de salud a la cual pertenecían, y cada caso fue reportado al Instituto Nacional de Salud. Las unidades de sangre con dos pruebas de tamización reactivas fueron incineradas, aquellas con una

sola muestra reactiva y que posteriormente no lo fueron continuaron en el proceso de preparación de las unidades para la donación.

El Banco de Sangre de la Fundación Valle del Lili cuenta con un programa de garantía de calidad con controles de calidad internos y externos, estos últimos realizados por el Instituto Nacional de Salud, el programa de *Medical Laboratory Evaluation* y el del *College of American Pathologists*.

Aquellos registros en los cuales se reportaron otras pruebas de tamización reactivas para más de una enfermedad infecciosa, se consideraron como reactivos concomitantes para dos marcadores de infección.

Análisis estadístico

Se hizo un análisis univariado. Para determinar el comportamiento de las variables numéricas, se usó la prueba de Shapiro Wilk; aquellas con $p > 0,05$ se consideraron con distribución normal y se presentaron con promedios y desviación estándar, y aquellas con distribución diferente a la normal se presentaron con mediana y rangos intercuartílicos como medida de resumen.

Las variables categóricas se expresaron como proporciones. La seroprevalencia acumulada de HTLV se calculó como una proporción, tomando como numerador el número total de donantes con prueba de tamización reactiva para HTLV y como denominador, a todos los donantes con prueba de tamización para HTLV durante el periodo del estudio. Entre 2012 y 2014 la seroprevalencia se ajustó mediante la prueba confirmatoria de *Western blot*. Se elaboró una línea de tendencia con los datos de las prevalencias calculadas por cada año para evaluar el comportamiento de la enfermedad durante el tiempo del estudio.

Consideraciones éticas

Este estudio se acogió a las normas internacionales de investigación del *Council for International Organizations of Medical Sciences* (CIOMS), a la Declaración de Helsinki y al Código de Nuremberg, así como a la normativa colombiana consignada en el artículo 11 de la Resolución 8430 de 1993. La investigación fue aprobada por el Comité de Ética en Investigación Biomédica de la Fundación Valle del Lili, según la carta de aprobación No. 209-2015.

Resultados

Entre enero de 2008 y diciembre de 2014 se evaluaron 77.117 registros de donantes a quienes

se les aplicaron pruebas de tamización para anticuerpos anti-HTLV I-II, de los cuales 184 resultaron reactivos con el método de CMIA, cifra equivalente a una seroprevalencia acumulada de 0,24 %. La mediana de edad fue de 37 años (rango intercuartílico: 24-48) y la reacción positiva fue más frecuente en mujeres, con 61 % de los donantes reactivos (cuadro 1).

Entre junio de 2012 y diciembre de 2014 se tamizaron 28.345 donantes, de los cuales 55 fueron doblemente reactivos para la prueba de tamización de CMIA, equivalente a una seroprevalencia de 0,23 %. De estas muestras, 27 fueron positivas en la prueba confirmatoria de *Western blot*, para una seroprevalencia ajustada de 0,10 % (figura 1).

Las seroprevalencias desagregada por año fueron de: 0,13 % (2008), 0,19 % (2009), 0,31 % (2010), 0,32 % (2011), 0,38 % (2012), 0,14 % (2013) y 0,13 % (2014). Las seroprevalencias ajustadas según los resultados en la prueba confirmatoria de *Western blot* entre 2012 y 2014 fueron de: 0,18 % (2012) 0,08 % (2013) y 0,07 % (2014) (figura 2).

La reacción positiva concomitante de HTLV I-II y otros marcadores de infección se presentó en 11 % de los donantes. Los marcadores de sífilis fueron

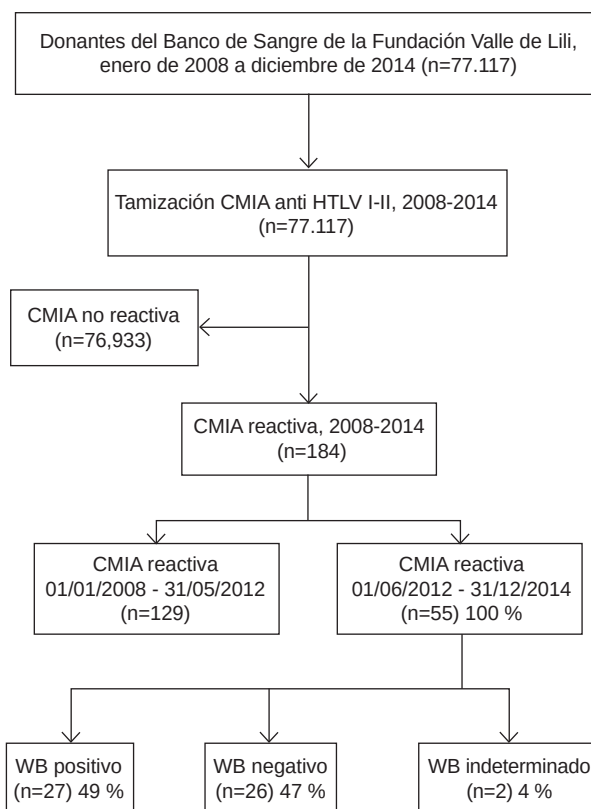


Figura 1. Flujograma del proceso de tamización y confirmación de HTLV I-II

CMIA: inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas
WB: *Western blot*

Cuadro 1. Características demográficas de la población de estudio

Variable	n	%
Sexo		
Hombres	72	39
Mujeres	112	61
Edad (años)		
18-25	52	28
26-35	42	23
36-45	36	20
46-55	35	19
56-65	19	10
Escolaridad		
Primaria	34	18
Secundaria	75	41
Técnica	31	17
Universitaria	37	20
Posgrado	1	1
No determinada	6	3
Seguridad social		
Subsidiado	29	16
Contributivo	130	71
No determinada	25	14
Estado civil		
Soltero	87	47
Casado	50	27
Unión libre	30	16
Divorciado	6	3
Viudo	4	2
No determinado	7	4

los más frecuentes (57 %), seguidos del HIV (19 %), la hepatitis B (14 %) y la hepatitis C (9 %) (figura 3).

En cuanto a las características de la donación, 97 % de las muestras reactivas en la prueba de tamización se habían obtenido por extracción de sangre total, 2 % por extracción de plaquetas y 1 % por transfusión de sangre autóloga. En relación con la clasificación ABO de los grupos sanguíneos, se encontró que 64 % pertenecía al grupo O, 22 % al A, 11 % al B, y 3 % al AB, en tanto que 91,3 % era Rh positivo.

Discusión

Entre el 5 y el 10 % de las personas infectadas con HTLV I-II desarrollan alguna enfermedad relacionada con este virus (6). La infección por HTLV en individuos asintomáticos no tiene ningún tratamiento establecido y solo algunas de las enfermedades relacionadas con el virus lo tienen (24). El hecho de ser el causante de enfermedades graves, como la leucemia o el linfoma de células T

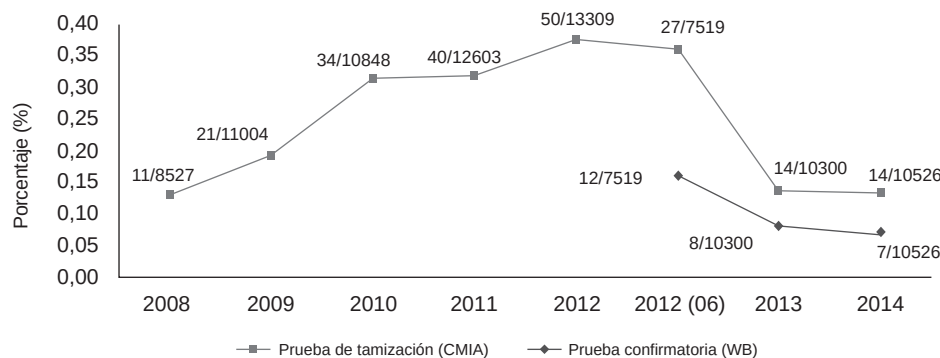


Figura 2. Comportamiento temporal de los resultados reactivos para HTLV en el inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas y positivos en el Western blot entre 2008 y 2014

El numerador representa el número total de pruebas reactivas por año. El denominador representa el número total de pruebas tomadas por año. BS-FVL: Banco de Sangre de la Fundación Valle del Lili; HTLV I-II: virus linfotrópico humano del tipo I-II; 2012 (06): periodo de tiempo entre el 1 de junio de 2012 y el 31 de diciembre de 2012; CMIA: inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas; WB: Western blot

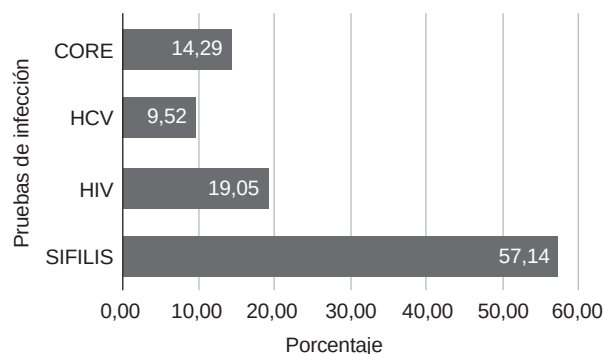


Figura 3. Resultados reactivos para marcadores de infección
HIV: virus de inmunodeficiencia humana
HCV: virus de la hepatitis C

y la paraparesia espástica tropical, ubica al HTLV en la categoría de los virus contra los cuales se trata de elaborar vacunas eficaces (25). Aunque algunos grupos de investigadores han trabajado arduamente en la elaboración de una vacuna, su labor ha sido infructuosa hasta el momento. En consecuencia, la única manera de prevenir las enfermedades relacionadas con el HTLV es evitar su contagio.

La transfusión de componentes de la sangre puede representar un importante riesgo de transmisión, especialmente en áreas endémicas en las cuales no se aplica la tamización para HTLV I-II (13). Los receptores de transfusiones infectados pueden ser portadores asintomáticos durante toda la vida, y son una fuente importante de transmisión del virus (24). En Colombia, la Red Nacional de Bancos de Sangre agrupa las unidades de servicios de transfusión en 26 departamentos, de los cuales

solo 10 realizaban pruebas de tamización para HTLV I-II por estar ubicados en zonas endémicas para la transmisión. No obstante, ya en 1988, Cortés, *et al.*, demostraron que la seroprevalencia del virus en zonas no endémicas era superior a la reportada en las zonas endémicas (21) y, a partir de febrero de 2014, el Ministerio de Salud y Protección Social estipuló como obligatorias para todos los bancos de sangre del país las pruebas de anticuerpos contra el HTLV I-II (Resolución 00437) (23).

El estudio reveló que la prevalencia acumulada de resultados reactivos en las pruebas de tamización para el HTLV I-II en el Banco de Sangre de la Fundación Valle del Lili fue de 0,24 %. En la mayoría de los países en donde se ha estudiado la seroprevalencia del virus, la distribución ha sido heterogénea y se ha encontrado una alta prevalencia en focos poblacionales pequeños y muy baja prevalencia en áreas cercanas (16). Es importante recalcar que el principal foco poblacional endémico registrado en el Banco de Sangre de la Fundación Valle del Lili es Puerto Tejada, Cauca, y, por lo tanto, su prevalencia resulta alta con respecto a lo esperado (18).

Al comparar los resultados de esta investigación con los estudios en bancos de sangre en los que solo se usaban pruebas de tamización, se encontró que en Bogotá, Bermúdez, *et al.*, reportaron una seroprevalencia de 0,15 % (19), mucho menor a la encontrada en el Banco de Sangre de la Fundación Valle del Lili. En Caracas, Venezuela, se reportó una seroprevalencia similar a la encontrada en este estudio (0,20 %) (13).

En el Banco de Sangre de la Fundación Valle del Lili, el 0,10 % de las pruebas por *Western blot* fueron positivas. Al compararlo con otros bancos de sangre que realizan pruebas confirmatorias, se observó que, en Bogotá, Martínez, *et al.*, encontraron 0,07 % de resultados positivos, cifra menor a la reportada en este estudio (20). Comparada con la del estudio de Cortés, *et al.*, la seroprevalencia en este fue mucho menor (0,45 %) (21), lo cual podría explicarse porque en el primero se incluyeron ocho bancos de sangre de diferentes ciudades colombianas (cuadro 2).

Algunos países han reportado seroprevalencias menores: Holanda, 0,002 % (26), Estados Unidos, 0,001 % (27) y Dinamarca, 0,003 %. A diferencia de lo reportado por investigadores brasileiros, quienes encontraron que la seroprevalencia se incrementaba con la edad (28-31), en esta investigación se registró una mayor prevalencia entre los menores de 30 años, en tanto que se estabilizó entre aquellos con mayor edad. En la literatura científica se ha reportado que una persona puede

presentar anticuerpos detectables muchos años después de la infección (32), lo cual sugiere que la población objeto de investigación adquirió el HTLV en etapas tempranas de la vida (cuadro 3). Además, Castro, *et al.*, encontraron que el mayor número de resultados reactivos frente a los marcadores de otras infecciones concomitantes con el HTLV se presentó con el virus de la hepatitis B (28), mientras que en el presente estudio la mayor concomitancia se presentó con el virus de la sífilis y el HIV. Las pruebas de tamización de los bancos de sangre son muy sensibles, por lo cual se presenta un gran número de falsos positivos. En este estudio, de los 55 donantes reactivos en la prueba de CMIA y de *Western blot* como prueba confirmatoria, 26 fueron falsos positivos.

En cuanto al comportamiento temporal de los resultados reactivos para HTLV I-II, la seroprevalencia aumentó de forma sucesiva desde el 2008 hasta el 2012, tendencia similar a la registrada en el estudio de Cruz, *et al.* (19). No se encontró asociación causal para este fenómeno, pues en

Cuadro 2. Estudios en bancos de sangre relacionados con la seroprevalencia de HTLV I-II

Autores	Estudio	Técnica	Fecha	Banco de sangre	Número de muestras analizadas	Prevalencia (%)
Zaninovic	A propósito de 5 casos de paraparesia espástica tropical en Puerto Tejada (Cauca)	Aglutinación de partículas (PA, Fujirebio Inc.) y ELISA	1997	Población de Puerto Tejada, Cauca	200	3
Trujillo, <i>et al.</i>	Seroprevalence and cofactors of HTLV-I infection in Tumaco, Colombia.		1988		1.077	2,8
Cortés, <i>et al.</i>	Estudio prospectivo seroepidemiológico de infección por el virus linfotrópico humano I y II (HTLV-I/II) en donantes de sangre de áreas colombianas endémicas y no endémicas	ELISA (Abbott) y WB	1998	Cruz Roja de Bogotá	207	0,96
				Hospital Regional de Leticia	85	3,52
				Hospital Universitario de Popayán	165	0,6
				Hospital San Pedro de Pasto	160	1,25
				Hospital Departamental de Buenaventura	70	1,42
				Hospital Civil de Ipiales	90	1,11
				Hospital Universitario de Cartagena	81	1,23
				Hospital San Andrés de Tumaco	80	2,5
				Global	2.854	0,45
Bermúdez, <i>et al.</i>	Seroprevalencia de tamización frente a virus linfotrópico de células T (HTLV) y factores asociados a confección en donantes voluntarios de sangre de Colombia	MicroELISA (ARCHITEC I-2000 de Abbott)	2008	Banco de Sangre Fundación Hematológica Colombia	93.377	0,08
			2009		98.396	0,12
			2010		100.658	0,28
			2011		141.494	0,23
				Global		0,17
Martínez, <i>et al.</i>	Seroprevalencia de anticuerpos para virus linfotrópicos humanos (HTLV I/II) en donantes de sangre de una clínica de Bogotá, Colombia, 1999-2004	ELISA de Murex (ABBOTT) y <i>Western blot</i>	1999-2004	Banco de Sangre Clínica Reina Sofía	8.913	0,07
León, <i>et al.</i>	Seropositividad al virus linfotrópico de células T humanas tipos I y II en donantes del Banco Municipal de Sangre de Caracas y factores de riesgo asociados	ELISA (Abbott)	2000-2001	Banco Municipal de Sangre de Caracas	23.413	0,20

Cuadro 3. Distribución por grupos de edad y según sexo de los donantes reactivos en la prueba de CMIA

Años	2008		2009		2010		2011		2012		2013		2014		Total general
Sexo	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	
Rango de edad (años)	n (%)		n (%)		n (%)		n (%)		n (%)		n (%)		n (%)		
18-29	1 (9,2)	2 (18)	2 (10)	4 (19)	9 (26)	3 (9)	8 (20)	7 (18)	16 (32)	8 (16)	3 (21)	1 (7)	5 (36)	1 (7)	70 (38)
30-39	2 (18)	1 (9,2)	1 (5)	1 (5)	5 (15)	4 (12)	4 (10)	5 (13)	6 (12)	3 (6)	1 (7)	1 (7)	0 (0)	2 (14)	36 (20)
40-49	2 (18)	0 (0)	5 (24)	3 (14)	3 (9)	3 (9)	6 (15)	3 (8)	5 (10)	3 (6)	1 (7)	1 (7)	3 (21)	1 (7)	39 (21)
50-65	2 (18)	1 (9,2)	3 (14)	2 (10)	5 (15)	2 (6)	4 (10)	3 (8)	6 (12)	3 (6)	2 (14)	4 (29)	2 (14)	0 (0)	39 (21)
Total por sexo	7 (64)	4 (36)	11 (52)	10 (48)	22 (65)	12 (35)	22 (55)	18 (45)	33 (66)	17 (34)	7 (50)	7 (50)	10 (71)	4 (29)	
Total general	11 (100)		21 (100)		34 (100)		40 (100)		50 (100)		14 (100)		14 (100)		184 (100)

este intervalo de tiempo no hubo cambios en la entrevista que se hace a los donantes ni en las pruebas de tamización utilizadas.

El Banco de Sangre de la Fundación Valle del Lili capta 20 % de todos los potenciales donantes del departamento del Valle, por lo tanto, los resultados de este estudio pueden extrapolarse a los donantes de los otros bancos de sangre de la ciudad, en la cual se ha estimado que uno de cada 500 donantes tendría una prueba de tamización reactiva para HTLV I-II. Dado que la población estudiada se seleccionó mediante una encuesta sobre los factores de riesgo para las enfermedades infecciosas, estos datos no representan la seroprevalencia de la población del suroccidente colombiano.

Los resultados de este estudio son un punto de partida para el desarrollo de futuros estudios poblacionales que amplíen el conocimiento sobre la dinámica de la transmisión y la carga de las enfermedades asociadas a la infección por HTLV I-II. De igual manera, refuerza la necesidad de implementar y fortalecer las estrategias dirigidas a interrumpir la cadena de la transmisión en las poblaciones en riesgo.

Agradecimientos

A Diana María Dávalos, por el apoyo constante en la labor investigativa de todos sus estudiantes y por su disposición a brindar soluciones ante las dificultades.

Conflicto de intereses

Todos los investigadores manifiestan no tener conflictos de intereses.

Financiación

Banco de Sangre y Centro de Investigaciones Clínicas de la Fundación Valle del Lili y Universidad ICESI.

Referencias

1. **García-Vallejo F.** Caracterización molecular y genómica del proceso de integración de provirus del virus linfotrópico humano (HTLV) tipo I. *Rev Acad Colomb Cienc.* 2006;30: 155-70.
2. **Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC.** Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci.* 1980;77:7415-9.
3. **Kalyanaraman VS, Narayanan R, Feorino P, Ramsey RB, Palmer EL, Chorbha T, et al.** Isolation and characterization of a human T cell leukemia virus type II from a hemophilia-A patient with pancytopenia. *EMBO J.* 1985;4:1455-60.
4. **Mahieux R, Gessain A.** The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: New members of the HTLV family. *Pathol Biol.* 2009;57:161-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2008.02.015>
5. **Gotuzzo-Herencia E, González-Lagos E, Verdonck-Bosteels K, Mayer-Arispe E, Ita-Nagy F, Clark-Leza D.** Veinte años de investigación sobre HTLV-1 y sus complicaciones médicas en el Perú: perspectivas generales. *Acta Médica Peru.* 2010;27:196-203.
6. **Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL.** Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene.* 2005;24:6058-68. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1208968>
7. **Gonçalves DU, Proietti FA, Ribas JG, Araújo MG, Pinheiro SR, Guedes AC, et al.** Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:577-89. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00063-09>.
8. **Matsuura E, Umehara F, Nose H, Higuchi I, Matsuoka E, Izumi K, et al.** Inclusion body myositis associated with human T-lymphotropic virus-type I infection: Eleven patients from an endemic area in Japan. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008;67:41-9. <http://dx.doi.org/10.1097/nen.0b013e31815f38b7>
9. **Tsukasaki K, Hermine O, Bazarbachi A, Ratner L, Ramos JC, Harrington W, et al.** Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: A proposal from an international consensus meeting. *J Clin Oncol.* 2009;27:453-9. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.18.2428>

10. **Blank A, Rosso F.** Hiperinfección por *Strongyloides stercoralis* en portadores del virus linfotrófico humano tipo I (HTLV-I). *Acta Méd Colomb.* 1996;21:122-6.
11. **Fujino T, Nagata Y.** HTLV-I transmission from mother to child. *J Reprod Immunol.* 2000;47:197-206.
12. **Osame M, Janssen R, Kubota H, Nishitani H, Igata A, Nagataki S, et al.** Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: Association with blood transfusion. *Ann Neurol.* 1990;28:50-6.
13. **León G, Quirós AM, López JL, Hung M, Díaz AM, Gonçalves J, et al.** Seropositividad al virus linfotrófico de células T humanas tipos I y II en donantes del Banco Municipal de Sangre de Caracas y factores de riesgo asociados. *Rev Panam Salud Pública.* 2003;13:117-24. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892003000200012>
14. **Chang YB, Kaidarova Z, Hindes D, Bravo M, Kiely N, Kamel H, et al.** Seroprevalence and demographic determinants of human T-lymphotropic virus type 1 and 2 infections among first-time blood donors--United States, 2000-2009. *J Infect Dis.* 2013;209:523-31. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit497>
15. **Alarcón-Villaverde J, Romaní-Romaní F, Montaña-Torres S, Zunt JR.** Vertical transmission of HTLV-1 in Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2011;28:101-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1726-46342011000100016>
16. **Gessain A, Cassar O.** Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front Microbiol.* 2012;3:388. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00388>
17. **Trujillo JM, Concha M, Muñoz A, Bergonzoli G, Mora C, Borrero I, et al.** Seroprevalence and cofactors of HTLV-I infection in Tumaco, Colombia. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1992;8:651-7. <http://dx.doi.org/10.1089/aid.1992.8.651>
18. **Zaninovic V, Moreno D, Payán C, Rodríguez A.** A propósito de 5 casos de paraparesia espástica tropical en Puerto Tejada (Cauca). *Colombia Médica.* 1997;28:67-70.
19. **Bermúdez HC, Enrique J, Collazos M, Sierra MR, Fonseca AA.** Seroprevalencia de tamizaje frente a virus linfotrófico de células T (HTLV) y factores asociados a coinfección en donantes voluntarios de sangre de Colombia. *Salud Uninorte.* 2014;30:95-103.
20. **Martínez-Nieto O, Isaza-Ruget M, Rangel-Espinosa N, Morales-Reyes OL.** Seroprevalencia de anticuerpos para virus linfotróficos humanos (HTLV I/II) en donantes de sangre de una clínica de Bogotá, Colombia. 1999-2004. *Rev Salud Pública.* 2007;9:253-61. <http://dx.doi.org/10.1590/S0124-00642007000200009>
21. **Buelvas AC, Beltrán M, Gallego GA, Isaza LM.** Estudio prospectivo seroepidemiológico de infección por el virus linfotrófico humano I y II (HTLV-I/II) en donantes de sangre de áreas colombianas endémicas y no endémicas. *Colombia Médica.* 1999;30:19-25.
22. **Red Nacional de Bancos de Sangre.** Informe Nacional de Indicadores. 1 de enero a 31 de diciembre de 2013. Fecha de consulta: 21 de abril de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/reas%20Estratgicas/Informe%20Anual%20Red%20Sangre%202013.pdf>
23. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Resolución número 000437. Fecha de consulta: 21 de abril de 2015. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%200437%20de%202014.pdf
24. **Gonçalves DU, Proietti FA, Ribas JG, Araújo MG, Pinheiro SR, Guedes AC, et al.** Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:577-89. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00063-09>
25. **de Thé G, Bomford R.** An HTLV-I vaccine: Why, how, for whom? *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1993;9:381-6.
26. **Zaaijer HL, Cuyper HT, Dudok de Wit C, Lelie PN.** Results of 1-year screening of donors in The Netherlands for human T-lymphotropic virus (HTLV) type I: Significance of Western blot patterns for confirmation of HTLV infection. *Transfusion.* 1994;34:877-80. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1537-2995.1994.341095026973.x>
27. **Centers for Disease Control and Prevention.** Current trends human T-lymphotropic virus type I screening in volunteer blood donors, United States, 1989. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1990;39:921-4.
28. **Viana GM, Nascimento MdoD, de Oliveira RA, Dos Santos AC, Galvão CdeS, da Silva MA.** Seroprevalence of HTLV-1/2 among blood donors in the state of Maranhão, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2014;36:50-3. <http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20140013>
29. **Galvão-Castro B, Loures L, Rodrigues LG, Sereno A, Ferreira-Júnior OC, Franco LG, et al.** Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: A nationwide Brazilian study. *Transfusion.* 1997;37:242-3. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1537-2995.1997.37297203532.x>
30. **Mota A, Nunes C, Melo A, Romeo M, Boasorte N, Dourado I, et al.** A case-control study of HTLV-infection among blood donors in Salvador, Bahia, Brazil - associated risk factors and trend towards declining prevalence. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2006;28:120-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842006000200011>
31. **Monteiro-de-Castro MS, Assunção RM, Proietti FA.** Spatial distribution of the human T-lymphotropic virus types I and II (HTLV-I/II) infection among blood donors of Hemominas Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1996. *Cad Saúde Pública.* 2001;17:1219-30. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2001000500014>
32. **Navas MC, Iglesias A, Martínez BM, Caraballo L.** Prevalencia de anticuerpos contra HTLV-1 en una población negra de Colombia. *Biomédica.* 1995;15:34-6. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v15i1.855>

ARTÍCULO ORIGINAL

Distribución geográfica del mono aullador rojo (*Alouatta seniculus*) y la fiebre amarilla en Colombia

Juan Piedrahita-Cortés, Diego Soler-Tovar

Grupo de Epidemiología y Salud Pública, Universidad de La Salle, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Colombia es un país con gran diversidad de primates no humanos, entre los cuales se destaca el mono aullador rojo (*Alouatta seniculus*) por su distribución y el papel que desempeña en la presentación de la fiebre amarilla.

Objetivo. Describir la coincidencia geográfica del hábitat del mono aullador rojo y la presencia de fiebre amarilla.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio de carácter descriptivo. Los antecedentes de la fiebre amarilla en Colombia se obtuvieron de los informes y boletines del Instituto Nacional de Salud y del estudio de 2013 de Segura, *et al.* La presencia de *A. seniculus* se determinó con base en la plataforma *Global Biodiversity Information Facility* y el Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia; los mapas se elaboraron con el programa Diva-Gis, y el modelo de nicho ecológico bajo las condiciones actuales, con el programa Maxent.

Resultados. Los departamentos con mayor presencia de *A. seniculus* fueron Antioquia, Meta y Casanare; en 69,5 % de los departamentos con antecedentes de notificación de fiebre amarilla también había *A. seniculus*. El modelo de nicho ecológico evidenció que Antioquia, Bolívar, La Guajira, Magdalena, Meta, Santander, Norte de Santander y Vichada tenían porciones de territorio con un índice de probabilidad cercano a 0,9 (90 %).

Conclusiones. En 69,5 % de los departamentos con antecedentes de fiebre amarilla se registró la presencia de *A. seniculus*, lo cual resulta relevante por el papel que los primates no humanos desempeñan como reservorio natural del virus y por su contribución en la presentación de la fiebre amarilla, lo cual les confiere gran utilidad como centinelas.

Palabras clave: *Alouatta*, enfermedades de los primates, fiebre amarilla, epidemiología, *Flavivirus*, medicina tropical, zoonosis, América Latina.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2929>

Geographical distribution of the red howler monkey (*Alouatta seniculus*) and yellow fever in Colombia

Introduction: Colombia is a country with an important diversity of non-human primates, of which the red howler monkey (*Alouatta seniculus*) stands out because of its distribution and the role it plays in the occurrence of yellow fever.

Objective: To describe the geographic co-occurrence of *Alouatta seniculus* and the reported presence of yellow fever.

Materials and methods: We conducted a descriptive study. The reported presence of yellow fever in Colombia was obtained from the reports and bulletins issued by the *Instituto Nacional de Salud*, and the study by Segura, *et al.* (2013). The occurrence of *A. seniculus* was determined based on the data from the Global Biodiversity Information Facility and the Colombian Biodiversity Information System. A map of the occurrence was developed using the DIVA-GIS program, and the ecological niche model under current conditions was created with the Maxent program.

Results: The departments with the highest occurrence of *A. seniculus* were Antioquia, Meta and Casanare; 69.5% of the departments with reported history of yellow fever had co-occurrence with *A. seniculus*. The ecological niche model showed that Antioquia, Bolívar, La Guajira, Magdalena, Meta, Santander, Norte de Santander and Vichada had geographical portions with a probability rate nearing to 0.9 (90%).

Contribución de los autores:

Juan Piedrahita-Cortés: revisión de literatura y escritura del manuscrito

Diego Soler-Tovar: diseño de mapas en Diva-Gis y modelos de nicho ecológico en Maxent, diseño y contribución a la estructuración del manuscrito

Todos los autores contribuyeron a la concepción de la idea de investigación, a la interpretación de los resultados y la redacción del manuscrito.

Conclusions: In 69.5% of the departments with a history of yellow fever there was co-occurrence with *A. seniculus*, which is relevant because non-human primates play a well-known role as natural reservoirs of the virus, and they might contribute to the occurrence of the yellow fever, which makes them very useful as sentinels.

Key words: *Alouatta*, primate diseases, yellow fever, epidemiology, *Flavivirus*, tropical medicine, zoonoses, Latin America.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2929>

Colombia es un país con una notable biodiversidad cuyo gran número de especies de fauna y flora se atribuye a su geografía ecuatorial y a su compleja topografía. El país es el cuarto más diverso del mundo en mamíferos registrados, con cerca de 471 especies nativas confirmadas. Es uno de los países más diversos del mundo en especies de primates junto con Brasil, Zaire, Camerún, Indonesia, Madagascar y Perú, pues cuenta con 31 especies y múltiples subespecies (1).

En este estudio la atención se centró en la especie *Alouatta seniculus*, por ser la de mayor distribución en el país, así como por su papel de huésped o reservorio del virus de la fiebre amarilla (1-3) (figura 1). La fiebre amarilla es una enfermedad viral aguda, producida por un arbovirus del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*, que además es zoonótica, endémica y con el riesgo de reemerger en seres humanos, pese a que existe vacuna, por lo cual se la considera de interés en salud pública (2,4,5).

Entre las condiciones que influyen en su aparición se destacan la amplia distribución geográfica de los vectores (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Haemogogus janthinomys* y *Sabethes* sp.), la deforestación, el crecimiento demográfico, la cobertura de la vacunación, los perfiles ocupacionales y la variabilidad climática, los cuales afectan la distribución del agente, del huésped y del vector (figura 2). A estos factores se suman, en Colombia, el desplazamiento forzado, la explotación de zonas selváticas vírgenes, la violencia y el narcotráfico, factores que complican la situación (4,6,7). La fiebre amarilla se combate con la vacunación y con adecuadas medidas de vigilancia (8).

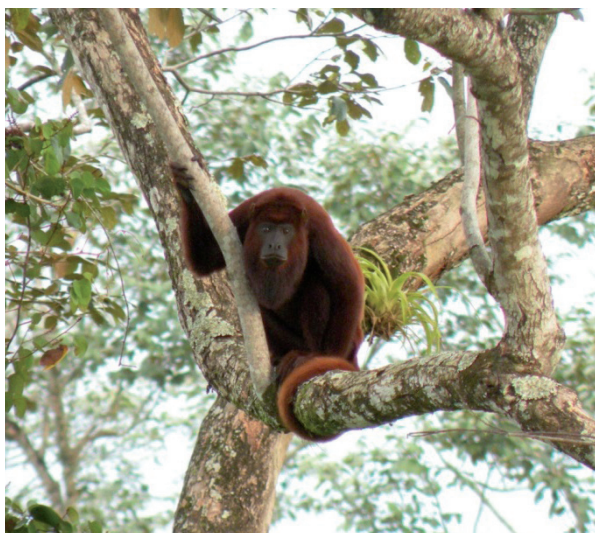


Figura 1. Mono aullador rojo (castaño) (*Alouatta seniculus*)

En el marco de las políticas frente a la enfermedad, en el país se han expedido los decretos 1693 de 1979, 2257 de 1986, 786 de 1990, y 2323 y 3518 de 2006, además de la Resolución 412 de 2000 y la adopción de lo dispuesto en el Reglamento Sanitario Internacional de 2005; en dichos decretos se establecen las obligaciones y las competencias frente a la enfermedad, pero en ninguno de estos instrumentos legales se reglamentan las medidas relacionadas con la presencia de los primates no humanos. Se sabe, además, que el tráfico de fauna y la interacción con los reservorios pueden representar un riesgo para los humanos. Por otro lado, la fiebre amarilla es una enfermedad de aparición cíclica que suele presentarse cada cinco o siete años y se sabe que hay circulación activa del virus selvático, característica que la hace más impredecible (9-11).

El objetivo del presente artículo fue describir la presencia simultánea de *A. seniculus*, establecida según la información disponible en la *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF) y en el Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia (SiB Colombia), y de antecedentes reportados de fiebre amarilla en Colombia.

Correspondencia:

Juan Piedrahita-Cortés, Carrera 7 N° 172-85, Programa de Medicina Veterinaria, Universidad de La Salle, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: (317) 375 4711

jmpcvet@gmail.com

Recibido: 30/06/15; aceptado: 10/02/16

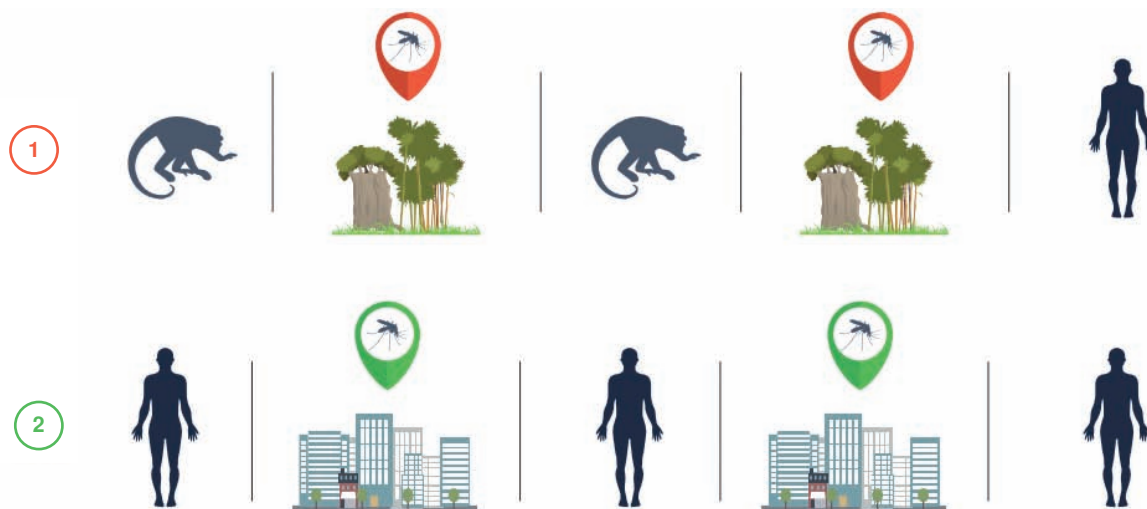


Figura 2. Ciclos de transmisión de la fiebre amarilla. 1: Ciclo de transmisión selvático; 2: Ciclo de transmisión urbano
Ilustración de David Mauricio Suárez

Materiales y métodos

Se hizo un estudio de carácter descriptivo. Los antecedentes de la presencia de fiebre amarilla en Colombia se obtuvieron de los informes y boletines del Instituto Nacional de Salud y de otras publicaciones, primordialmente del informe de fiebre amarilla en el cuarto periodo epidemiológico de 2015, y del artículo “Tendencias de la mortalidad por fiebre amarilla, Colombia, 1998-2009”, publicado por Segura, *et al.*, en el 2013 (12).

La presencia de *A. seniculus* se determinó a partir de los datos de georreferenciación disponibles en la *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF - <http://www.gbif.org>) y en el Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia (SiB Colombia - <http://www.sibcolombia.net/web/sib/home>); con esta información, se elaboró el mapa de los sitios donde se encuentra la especie en Colombia usando el programa Diva-Gis (<http://www.diva-gis.org>), el cual es de libre acceso, no comercial, de fácil manejo para el mapeo y análisis de la información espacial, y de mucha utilidad en el estudio de la distribución de organismos para explicar patrones geográficos y ecológicos. Se elaboró el modelo de nicho ecológico bajo las condiciones actuales con el programa de modelado de máxima entropía Maxent (<http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent/>), utilizando 19 capas bioclimáticas en una resolución de 2,5 arc-minutos (www.worldclim.org).

Para la búsqueda de la literatura científica, se emplearon los siguientes términos de los Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS):

(“Yellow Fever” OR “Fiebre Amarilla”) AND (“Primates” OR “Alouatta”) AND (“Colombia” OR “America”). Las bases de datos y los sistemas de índices y resúmenes (SIRes) utilizados fueron: Bireme, Doaj, Lilacs, Pubmed, Redalyc, Scielo, Science Direct y Scopus.

Resultados

A continuación se presentan los mapas de la distribución de *A. seniculus* en Colombia según la GBIF y el SiB Colombia (figura 3), en los cuales se observa que los departamentos con mayor número de registros para la especie son Antioquia, Meta y Casanare. Por otro lado, se presenta el modelo de nicho ecológico bajo las condiciones actuales (figura 4), en el cual se plantea un índice de probabilidad de 0 a 1 para la presencia de la especie en estudio; en el modelo se destacan Antioquia, Bolívar, La Guajira, Magdalena, Meta, Santander, Norte de Santander y Vichada como los departamentos con zonas geográficas cuyo índice de probabilidad para la presencia de *A. seniculus* es cercano a 0,9 (90 %), y Atlántico, Boyacá, Casanare, Cesar, Córdoba, Sucre y Risaralda, como aquellos con zonas geográficas con un índice de probabilidad cercano a 0,7 (70 %), el cual se basa en los 19 factores bioclimáticos determinantes de la presencia del mono aullador rojo; como se ve, la mayor favorabilidad para la presencia de la especie se da en la región andina.

En el mapa de los casos confirmados de fiebre amarilla a nivel municipal (figura 5) reportados en el informe del Instituto Nacional de Salud para



Figura 3. Localidades (puntos rojos) con presencia de *Alouatta seniculus*. Se destacan Antioquia, Meta y Casanare (modelado con el programa Diva-Gis)

Fuente: SiB Colombia y GBIF.org (27 de febrero de 2015, GBIF Occurrence - <http://doi.org/10.15468/dl.94tw36>)

el cuarto periodo epidemiológico de 2015, se observa que las regiones Caribe y de la Orinoquia fueron las más afectadas. Según Segura, *et al.*, los departamentos con antecedentes de casos probables o confirmados de fiebre amarilla de 2006 a 2009, así como de mortalidad entre 1998 y 2009, fueron 23, incluido el distrito de Bogotá, lo cual se correlacionó con la presencia geográfica de *A. seniculus* según la GBIF y el SiB Colombia (cuadro 1) (12).

En 69,5 % de los departamentos con antecedentes de fiebre amarilla existe el mono aullador rojo, según los registros de la GBIF y el SiB Colombia, y en 30,5 % no había registro de su presencia. Por otro lado, en siete departamentos había *A. seniculus*, pero no existían antecedentes de fiebre amarilla.

Se evidenció que en 50 % de los 32 departamentos de Colombia había simultáneamente antecedentes de fiebre amarilla y monos aulladores rojos.

Discusión

Este es un análisis básico que no permitió establecer de manera concluyente la existencia de primates no humanos en las áreas con antecedentes de casos de fiebre amarilla, pero, con base en la evidencia científica disponible en torno al papel que estos desempeñan como reservorios del virus y los antecedentes de epizootias en investigaciones de casos de fiebre amarilla, es probable que dichas variables tengan una correlación significativa. La participación del mono aullador rojo en el ciclo de transmisión del agente de la fiebre amarilla selvática no debe generar rechazo de los primates no humanos en el territorio nacional, por el contrario, ello debe fomentar su estudio y la adopción de medidas de protección para aprovecharlos como centinelas de la enfermedad en Colombia (2,4,5).

La plataforma GBIF ha sido desarrollada por una organización intergubernamental que integra 53 países y 43 organizaciones internacionales. Funciona como una red de nodos nacionales de acceso libre a los datos de biodiversidad de todo el mundo para apoyar la investigación científica, fomentar la conservación biológica y favorecer el desarrollo sostenible; el SiB Colombia es una red informática de acceso libre que facilita herramientas para la integración, publicación y consulta de la información sobre biodiversidad. Sin embargo, el registro de *A. seniculus* está sesgado por el número de registros para la especie en Colombia. Es necesario anotar que el hecho de que no haya registros de su presencia puede estar relacionado con la cantidad de investigaciones y, en consecuencia, el número de localidades registradas en una y otra plataforma.

Este sistema es útil porque no existe un conocimiento completo sobre la tendencia, la distribución o los antecedentes de la fiebre amarilla en los reservorios y puede proveer una oportunidad para incentivar las investigaciones en salud en asociación con redes y organizaciones de biodiversidad en el mundo. Para el caso de Colombia, no existe un estudio consolidado sobre antecedentes de la fiebre amarilla en los reservorios, pero sí existen anotaciones sobre epizootias en algunos documentos independientes (cuadro 2). Otros autores, como Defler, han llevado a cabo estudios sobre la distribución de diversos primates en Colombia, los cuales son muy útiles desde el punto de vista biológico porque detallan el tipo de ambientes y de climas de algunas de las regiones

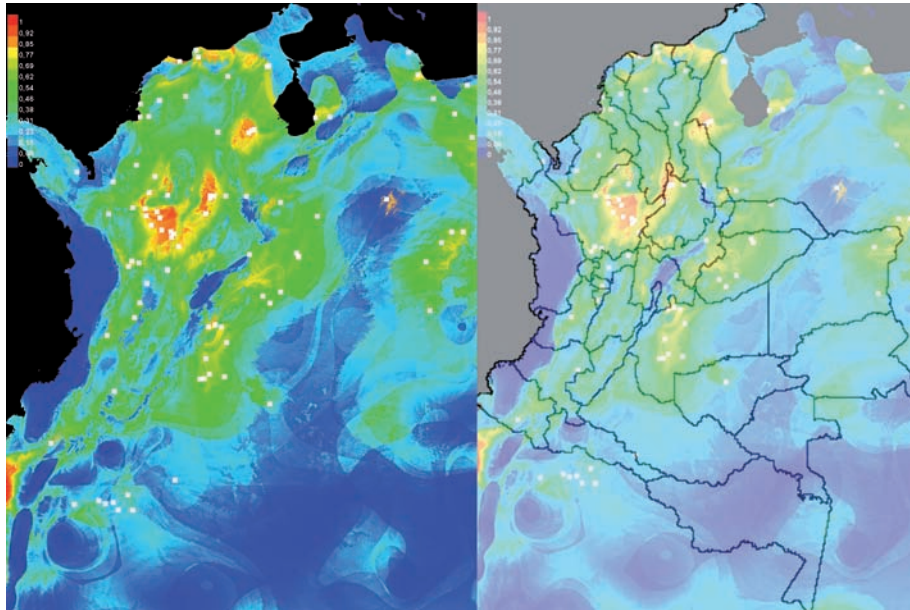


Figura 4. Modelo de nicho ecológico bajo las condiciones actuales para *Aouatta seniculus* en Colombia. Se destacan Antioquia, Bolívar, La Guajira, Magdalena, Meta, Santander, Norte de Santander y Vichada (elaborado con el programa Maxent, 2015)

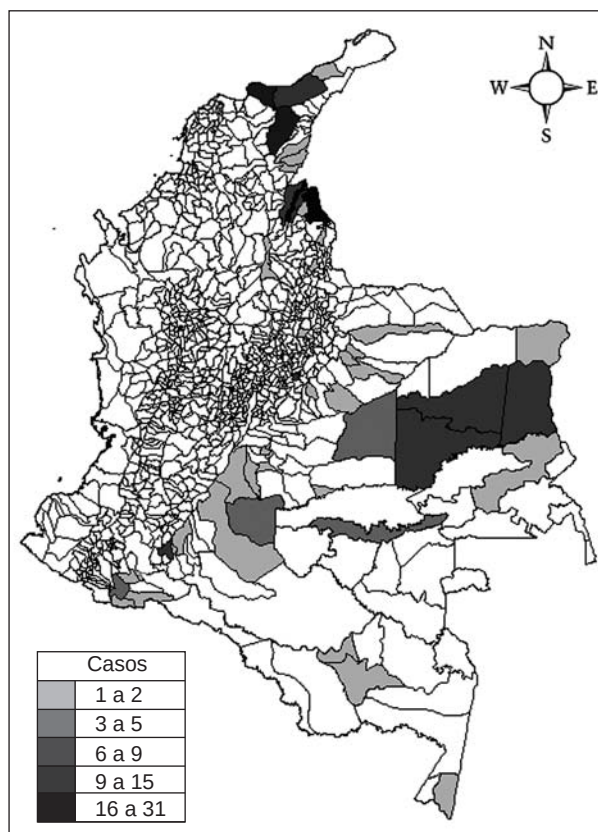


Figura 5. Municipios con casos confirmados de fiebre amarilla entre 2000 y 2009. Adaptado del informe de la enfermedad en el cuarto periodo epidemiológico, Instituto Nacional de Salud, 2015 (modelado con el programa DIVA-GIS)

donde se encuentran las especies; no obstante, el análisis geográfico y de límites políticos en el país puede resultar más dispendioso (1). De cualquier modo, se sugiere tener en cuenta el trabajo de este y otros autores nacionales para futuras investigaciones.

Es fundamental establecer la coincidencia entre la presencia de primates no humanos y los antecedentes de fiebre amarilla, así como el modelo de nicho ecológico bajo las condiciones actuales, debido al papel que desempeñan dichos primates como reservorios naturales o huéspedes de la enfermedad. Sin embargo, es difícil elaborar una lista exhaustiva de los primates no humanos que pueden ser potenciales reservorios del virus de la fiebre amarilla, aunque se pueden puntualizar experiencias y aportes de entidades como la Organización Panamericana de Salud (OPS), los organismos del sector ambiental de países latinoamericanos, así como la información independiente, para determinar las especies de mayor distribución e importancia epidemiológica durante el ciclo de aparición de la fiebre amarilla selvática. Entre tales especies se destacan las del género *Aouatta* spp., que resulta involucrado en la mayoría de los casos de muerte reportados en primates no humanos en zonas con circulación comprobada del virus de la fiebre amarilla. Los dos aspectos clave para resaltar en este género son su amplia distribución

Cuadro 1. Casos y muertes por fiebre amarilla (Segura, *et al.*, 2013) (12) y presencia de *Alouatta seniculus* (GBIF, 2015)

Departamento o distrito	Casos de fiebre amarilla 2006 a 2009		Muertes por fiebre amarilla 1998 a 2009	Presencia de <i>Alouatta seniculus</i> (según registros de GBIF y SiB Colombia, 2015)
	Probables	Confirmados		
Meta	32	3	6	8
Vichada	9	1	2	3
Bogotá	6	0	1	0
Atlántico	6	0	0	1
Caquetá	5	1	5	1
Casanare	4	0	3	5
Amazonas	3	0	0	0
Putumayo	2	0	1	0
Caldas	2	0	1	2
Sucre	2	0	0	3
Norte de Santander	2	0	24	4
Huila	1	0	0	0
Guainía	1	0	1	0
Bolívar	1	1	0	1
Tolima	1	0	0	0
Boyacá	1	0	1	1
Santander	1	0	1	5
Guaviare	1	0	2	1
Risaralda	1	0	0	1
Antioquia	1	0	0	17
Magdalena	1	0	0	3
Cesar	0	0	2	2
Vaupés	0	0	1	0
Córdoba	0	0	0	2
Chocó	0	0	0	1
Valle	0	0	0	1
Quindío	0	0	0	1
Nariño	0	0	0	1
Cauca	0	0	0	1
Arauca	0	0	0	1
La Guajira	0	0	0	0
Cundinamarca	0	0	0	0
San Andrés y Providencia	0	0	0	0

Cuadro 2. Reportes de casos confirmados de fiebre amarilla en primates no humanos en Colombia

Especie	Número de casos confirmados/estudiados	Método de diagnóstico	Año del hallazgo	Lugar	Fuente
<i>Alouatta seniculus</i>	4/31 Otros cuatro esqueletos observados en excursión	Seroneutralización	1979	Bosques de Mariangola y Río Seco, Cesar	Vídales, <i>et al.</i> Biomédica 1981;4:171-86
<i>Alouatta seniculus rufiventris</i>	1/1	Sin datos	2003	Corregimiento de Minca, Santa Marta	Velandia, Revista MVZ Córdoba. 2004;9:459
<i>Alouatta</i> spp.	4/5	Inmunohistoquímica y reacción en cadena de la polimerasa	2003 y 2004	Cesar y Magdalena	Méndez, <i>et al.</i> Biomédica 2007;27:461-7
<i>Alouatta</i> spp.	2/2 Otros diez muertos de tres manadas distintas	Aislamiento viral	2003 y 2004	Parque Ecológico los Besotes, Valledupar, Cesar	OPS/OMS EER Noticias Semanales Vol. 2, No. 1, 8 enero de 2004
<i>Alouatta seniculus</i>	Sin datos	Inmunohistoquímica	2004	Parque Ecológico los Besotes, Valledupar, Cesar	INS. Boletín Epidemiológico No. 3, 18 a 24 de enero de 2004

en selvas de Centroamérica y Suramérica, y su gran sensibilidad a pequeñas concentraciones de inoculación del virus (3,4,13,14).

Otro aspecto importante en la definición de la importancia epidemiológica de los reservorios de la enfermedad, es reconocer que su presencia en las zonas selváticas de Colombia está condicionada por algunos factores ambientales que pueden modificar su distribución. Para referirse a la zoogeografía de las distintas especies y subespecies de primates no humanos en Colombia, es preciso describir el efecto de las diferencias altitudinales que se presentan en el país. Se sabe que el número de especies disminuye a medida que aumenta la altura sobre el nivel del mar, lo cual se debe al cambio de temperatura, cuyo gradiente térmico con relación a la altitud es de 0,55 °C menos por cada 100 metros adicionales de altura.

Esas diferencias térmicas ejercen una gran presión en la supervivencia de los primates no humanos y se pueden explicar por dos aspectos fundamentales:

1) el efecto altitudinal implica consecuencias primarias sobre la diversidad de vegetales boscosos, que afecta, a su vez, la disponibilidad de alimento para los primates que allí habitan: a mayor altitud, menor disponibilidad de alimento;

2) el efecto primario de la altura y la temperatura sobre la tolerancia individual de la especie en cuestión implica que los pequeños primates no humanos que habitan Colombia tienen una tolerancia térmica restringida, es decir, pertenecen a especies estenotermas propias de rangos estrechos de temperatura que oscilan entre los 23 y los 28 °C, muy sensibles a los cambios térmicos, por lo cual a mayor altitud y menor temperatura, menor también la tolerancia de los primates. Además, los aulladores requieren de zonas boscosas de estructura diversa para su desplazamiento y su alimentación (1,15).

Dado que la vigilancia de la fiebre amarilla en Colombia no se hace en los reservorios, los mapas y la comprensión de la enfermedad se construyen a partir de los casos humanos. Se entiende que los sectores de salud y del ambiente son los responsables de generar ese conocimiento en el país, pero hoy no hay un sistema de vigilancia destinado a la detección y descripción del perfil epidemiológico de la enfermedad que recurra a sus reservorios naturales como centinelas, lo que permitiría fortalecer las acciones en salud humana y animal, así como priorizar zonas geográficas para

su investigación y prevención (5,13,16), además de consolidar los antecedentes de la enfermedad en el reservorio natural.

Considerando que algunos primates no humanos como *A. seniculus* son más propensos a la enfermedad, e históricamente se han relacionado más frecuentemente con la aparición de la fiebre amarilla, que su distribución depende de aspectos ambientales y que desempeñan un papel valioso como indicadores biológicos o centinelas de la circulación viral en zonas selváticas, el determinar la distribución geográfica de la enfermedad y de estos primates constituye un primer paso para establecer lineamientos de vigilancia epidemiológica, tal como lo señalan las experiencias de Argentina o Brasil, en donde se han elaborado protocolos para la vigilancia epidemiológica de epizootias de fiebre amarilla (16,17).

La fiebre amarilla es una enfermedad zoonótica de transmisión vectorial. Los principales vectores que se encargan de su transmisión son *A. aegypti* y *A. albopictus* a nivel doméstico, y *H. janthynomis* y *Sabethes* sp. a nivel selvático. En Latinoamérica y en Colombia se lleva a cabo, asimismo, la vigilancia entomológica como apoyo a las decisiones en salud; en los protocolos de vigilancia de fiebre amarilla de países como Brasil, también se contempla la vigilancia en los vectores, para lo cual es importante generar el conocimiento sobre la presencia simultánea de la enfermedad, el reservorio y los vectores, con el fin de tener una visión más completa respaldada por el trabajo interdisciplinario de las áreas de medicina humana, médica veterinaria y otras ciencias biológicas para entender la ecología de las enfermedades transmitidas por vectores (18-20).

Algunos autores han planteado que el propósito de los sistemas de vigilancia en salud animal para el desarrollo de políticas en salud pública debe orientarse a formular hipótesis causales y determinar los factores de riesgo y los protectores asociados a la aparición de la enfermedad, pero también, a estudiar las características ambientales y los factores determinantes propios de la población de interés para llegar a conclusiones contextualizadas (20). Sin embargo, no hay estudios detallados sobre la presencia de los primates no humanos como un factor de riesgo para la fiebre amarilla en Colombia, lo cual va más allá de la descripción de epizootias en el curso de brotes de la enfermedad en humanos. Por otro lado, son más comunes los estudios que se basan en los análisis de riesgo y

en la priorización de las poblaciones humanas que deben someterse a la vacunación que en el uso de los primates no humanos como centinelas de la circulación viral en el ámbito selvático (5,15,17).

En otro estudio para determinar los factores de riesgo eco-entomológicos de la emergencia de arbovirus en zonas húmedas, se encontraron relaciones significativas en las frecuencias de cohabitación de vectores y reservorios. De cualquier modo, el estudio se centró en el virus del Nilo occidental y la presencia de aves con posibilidad de adquirirlo, aunque se ejemplificó la forma en que la coincidencia de huéspedes sensibles y vectores competentes puede representar un factor de riesgo para la emergencia o reemergencia de arbovirus en condiciones ambientales adecuadas (21).

En el 2007 se emitieron las guías de promoción de la salud y prevención de enfermedades en salud pública por parte del entonces Ministerio de la Protección Social de Colombia (22), en las cuales se determinó que los factores de riesgo propios de la enfermedad en humanos incluyen los siguientes: el ingreso a regiones enzoóticas sin vacunación; el tipo de ocupación, por ejemplo, en labores de tala de árboles (lo cual produce la reducción del número de mosquitos); el final de la época de lluvias cuando la densidad de los vectores es alta y la gente prepara las tierras para la siembra o la ganadería, y ser hombre entre los 15 y los 40 años de edad (los hombres se ven afectados cuatro veces más que las mujeres y suelen ocuparse más en el trabajo rural). Otros factores de riesgo de urbanización de la fiebre amarilla se relacionan con la expansión geográfica y el alto grado de infestación de las zonas urbanas por *A. aegypti*. El desplazamiento de la población por causa del conflicto armado que afecta el país también se estableció, entonces, como un factor de riesgo, pues favorece el asentamiento de poblaciones no vacunadas en áreas selváticas.

En el presente estudio se concluyó que, según los registros de la GBIF, en 69,5 % de los 23 departamentos con antecedentes de fiebre amarilla había *A. seniculus*, es decir, que en 50 % de los departamentos de Colombia había antecedentes de fiebre amarilla y registros de esta especie.

Los datos obtenidos de la GBIF son importantes porque no existe un conocimiento cabal sobre la distribución de los primates no humanos en Colombia, especialmente *A. seniculus*, ni de su relación con los antecedentes reportados de fiebre amarilla en el país. Aunque la información

que se presenta no es definitiva, pues dependía del número de investigaciones y registros de la especie en Colombia en la plataforma consultada, el empleo de estas bases de datos es valioso para el estudio de temas de interés en salud pública.

Se sabe el papel que los primates no humanos desempeñan en la aparición de la fiebre amarilla, por lo que su empleo como centinelas de la circulación viral puede aportar enormemente a las estrategias de vigilancia de la enfermedad. Su relevancia como indicadores biológicos debe representar un incentivo para su estudio y protección, y para ampliar el conocimiento sobre la presencia simultánea de la enfermedad y el reservorio en el contexto de la formulación de nuevas investigaciones en salud y ambiente.

Debe incentivarse el trabajo interdisciplinario en medicina, medicina veterinaria y otras ciencias biológicas desde la perspectiva de la epidemiología y la salud pública, para entender mejor la ecología de las enfermedades transmitidas por vectores, así como para articular los sistemas de vigilancia en salud humana y animal, en especial de especies silvestres, a cargo de las autoridades de salud y ambiente.

Agradecimientos

A Pedro Enrique Navas-Suárez, del Departamento de Patología Comparativa y Experimental de la Universidad de São Paulo, Brasil; a Mauricio Javier Vera, del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia; a David Mauricio Suárez, diseñador gráfico de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, y a Hernán David Maestre Piedrahita, diseñador industrial de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos no tener conflicto de intereses en la realización de este artículo.

Financiación

El desarrollo del presente artículo no requirió de fuentes de financiación.

Referencias

1. Defler TR. Historia natural de los primates colombianos. Segunda edición. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2010. p. 324-34.
2. Rifakis PM, Benítez JA, De la Paz-Pineda J, Rodríguez-Morales AJ. Epizootics of yellow fever in Venezuela (2004-2005) an emerging zoonotic disease. Ann NY Acad Sci. 2006;1081:57-60. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1373.005>

3. **Auguste AJ, Lemey P, Pybus OG, Suchard MA, Salas RA, Adesiyun AA, et al.** Yellow fever virus maintenance in Trinidad and its dispersal throughout the Americas. *J Virol*. 2010;84:9967-77. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00588-10>
4. **Lima MA, Romano-Lieber NS, Duarte AM.** Circulation of antibodies against yellow fever virus in a simian population in the area of Porto Primavera Hydroelectric Plant, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2010;52:11-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652010000100002>
5. **Almeida MA, Cardoso J da C, Dos Santos E, da Fonseca DF, Cruz LL, Faraco FJ, et al.** Surveillance for yellow fever virus in non-human primates in Southern Brazil, 2001–2011: A tool for prioritizing human populations for vaccination. *PLoS Pathog*. 2014;8:e2741. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002741>
6. **Batista PM, Andreotti R, Almeida PS, Marques AC, Rodrigues SG, Chiang JO, et al.** Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46:684-90. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0181-2013>
7. **Câmara FP, Gomes AL, Carvalho LM, Castello LG.** Dynamic behavior of sylvatic yellow fever in Brazil (1954-2008). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44:297-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011005000024>
8. **Méndez JA, Parra E, Neira M, Rey GJ.** Detección por reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa del virus de la fiebre amarilla en monos silvestres: una herramienta sensible para la vigilancia epidemiológica. *Biomédica*. 2007;7:461-7 <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v27i3.209>
9. **Velandia M.** La reemergencia de la fiebre amarilla en Colombia, 2003. *Revista MVZCórdoba*. 2004;9:459.
10. **Romano AP, Costa ZG, Ramos DG, Andrade MA, Jayme V de S, Almeida MA, et al.** Yellow fever outbreaks in unvaccinated populations, Brazil, 2008-2009. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e2740. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002740>
11. **Vasconcelos PF.** Yellow fever in Brazil: Thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. *Rev Saúde Pública*. 2010;44:1144-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102010005000046>
12. **Segura AM, Cardona D, Osley M.** Tendencias de la mortalidad por fiebre amarilla, Colombia, 1998-2009. *Biomédica*. 2013;33(Supl.1):52-62. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.698>
13. **Tranquilin MV, Lehmkuhl RC, Maron A, Silva LR, Ziliotto L, Seki MC, et al.** First report of yellow fever virus in non-human primates in the State of Paraná, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46:522-4. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0106-2013>
14. **Carrington CV, Auguste AJ.** Evolutionary and ecological factors underlying the tempo and distribution of yellow fever virus activity. *Infect Genet Evol*. 2013;13:198-210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.015>
15. **Moreno ES, Spinola R, Tengan CH, Brasil RA, Siciliano MM, Coimbra TL, et al.** Yellow fever epizootics in non-human primates, São Paulo state, Brazil, 2008-2009. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2013;55:45-50. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652013000100008>
16. **Moreno ES, Barata R de C.** Methodology for definition of yellow fever priority areas, based on environmental variables and multiple correspondence analyses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1658. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001658>
17. **Bicca-Marques JC, Freitas DS.** The role of monkeys, mosquitoes, and humans in the occurrence of a yellow fever outbreak in a fragmented landscape in south Brazil: Protecting howler monkeys is a matter of public health. *Trop Conserv Sci*. 2010;3:78-89.
18. **Bryant JE, Holmes EC, Barret AD.** Out of Africa: A molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog*. 2010;3:e75. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0030075>
19. **Gardner CL, Ryman KD.** Yellow fever: A reemerging threat. *Clin Lab Med*. 2010;30:237-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2010.01.001>
20. **Hoinville LJ, Alban L, Drewe JA, Gibbens JC, Gustafson J, Häsler B, et al.** Proposed terms and concepts for describing and evaluating animal-health surveillance systems. *Prev Vet Med*. 2013;112:1-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.06.006>
21. **Bañares AB, Marí RB, Chordá-Olmos FA, Jiménez-Peydro R.** Factores de riesgo eco-entomológicos en la emergencia de arbovirosis en las zonas húmedas de la comunidad valenciana. *Bol Mal Salud Amb*. 2012;52:257-67.
22. **Ministerio de la Protección Social.** Guía 22. Guía de fiebre amarilla. En: Guías de Promoción de la Salud y Prevención de Enfermedades en la Salud Pública. Bogotá: Colección Programa de Apoyo a la Reforma de Salud (PARS), Ministerio de la Protección Social (MPS); 2007. p.227-45.

ARTÍCULO ORIGINAL

Comportamiento de la mortalidad por dengue en Colombia entre 1985 y 2012

Pablo Chaparro-Narváez, Willian León-Quevedo, Carlos Andrés Castañeda-Orjuela

Observatorio Nacional de Salud, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El dengue en Colombia es un importante problema de salud pública debido a las enormes pérdidas económicas y sociales que ha provocado, especialmente durante los picos epidémicos.

Objetivo. Describir el comportamiento de la mortalidad por dengue en Colombia entre 1985 y 2012.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo. La información se obtuvo de las bases de datos de mortalidad y de las proyecciones de población de 1985 a 2012 del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Se estimaron tasas de mortalidad, razón de tasas y letalidad.

Resultados. Se registraron 1.990 muertes por dengue durante el periodo señalado. Las tasas de mortalidad por dengue aumentaron entre 1985 y 1998. Las tasas más altas se presentaron en hombres menores de 5 años y de 65 o más años de edad. Entre 1995 y 2012 los municipios de categorías 1 a 4 también presentaron las tasas más altas. La letalidad durante el periodo varió entre 0,01 y 0,39 %.

Conclusión. El dengue es una enfermedad evitable que debería desaparecer de las estadísticas de mortalidad como causa de defunción. La muerte es evitable en la medida en que se implementen y evalúen las actividades propuestas en la Estrategia de Gestión Integrada (EGI)-Dengue. Se recomienda impulsar el desarrollo de una cultura informática que contribuya a la toma de decisiones y a priorizar la utilización de los recursos asignados.

Palabras clave: dengue/mortalidad, registros de mortalidad, epidemiología, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.3009>

Dengue mortality in Colombia, 1985-2012

Introduction: Dengue in Colombia is an important public health problem due to the huge economic and social costs it has caused, especially during the disease outbreaks.

Objective: To describe the behavior of dengue mortality in Colombia between 1985 and 2012.

Materials and methods: We conducted a descriptive study. Information was obtained from mortality and population projection databases provided by the *Departamento Administrativo Nacional de Estadística* (DANE) for the 1985-2012 period. Mortality rates, rate ratios, and case fatality rates were estimated.

Results: A total of 1,990 dengue deaths were registered during this period in Colombia. Dengue mortality rates presented an increasing trend with statistical significance between 1985 and 1998. Higher mortality rates were reported in men both younger than 5 years and older than 65 years. Between 1995 and 2012, category 1 to 4 municipalities reported the highest mortality rates. Case fatality rates varied during the period between 0.01% and 0.39%.

Conclusion: Dengue is an avoidable disease that should disappear from mortality statistics as a cause of death. The event is avoidable if the proposed activities from the *Estrategia de Gestión Integrada* (EGI)-Dengue are implemented and evaluated. We recommend encouraging the development of an informational culture to contribute to decision making and prioritizing resource allocation.

Key words: dengue/mortality, mortality registries, epidemiology, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.3009>

Correspondencia:

Pablo Chaparro-Narváez, Observatorio Nacional de Salud, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N° 51-20, bloque B, oficina 208, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: 220 7700, extensión 1389
pchaparro@ins.gov.co

Recibido: 30/07/15; aceptado: 10/02/16

La infección producida por el virus del dengue se considera como una de las enfermedades emergentes y reemergentes más importantes, ya que constituye una amenaza para un tercio de la población mundial (1). Entre los factores responsables de su emergencia y reemergencia,

Contribución de los autores:

Todos los autores participaron en el diseño del estudio, el análisis estadístico, la discusión de resultados y la redacción del manuscrito.

se han identificado el crecimiento de la población, la urbanización no planificada, el incremento de los viajes aéreos, las migraciones y el deterioro de los programas de control (2,3).

El dengue es una enfermedad infecciosa, endémica en muchos países tropicales y subtropicales, causada por un virus ARN del género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*), del cual se conocen cuatro serotipos, cada uno de ellos con capacidad de producir la enfermedad. El virus es transmitido a los humanos por la picadura del mosquito hembra infectado del género *Aedes*. Desde el punto de vista clínico, esta infección puede cursar asintomática (4,5) o con una gran variedad de síntomas, con evolución y resultados impredecibles (6).

En el 2010, se estimaba que el dengue causó alrededor de 96 millones de infecciones aparentes a nivel mundial, de las cuales 66,8 millones ocurrieron en Asia, 15,7 millones en África, 13,3 millones en las Américas y 0,18 millones en Oceanía. Asimismo, se calculó que era el causante de 293,9 millones de infecciones no aparentes (7). En ese mismo año, fue el responsable de la pérdida de 825.000 (344.000 a 1'412.000) años de vida ajustados por discapacidad (AVAD), es decir, 12 (5 a 20) AVAD por cada 100.000 habitantes (8). Se ha establecido que 3.970 millones de personas en 128 países están en riesgo de infectarse con el virus del dengue (9).

El dengue ha sido una de las principales causas de hospitalización y muerte en los países asiáticos y de América Latina (10), y se ha establecido que anualmente es el responsable de cerca de 22.000 muertes en el mundo (4,7,11), muchas de ellas asociadas con el dengue hemorrágico, o dengue con signos de alarma (12), y con el dengue grave (6). Se ha calculado que la tasa de mortalidad por dengue hemorrágico en la mayoría de los países es de alrededor de 5 %, y que los niños y adultos jóvenes son los más afectados (13), así como los ancianos y los pacientes con enfermedades concomitantes (14,15) como la diabetes y la hipertensión (16). Entre los factores que se asocian con la muerte por dengue están los que facilitan la transmisión del virus, la gravedad de la enfermedad, las barreras de acceso a los servicios de salud, la residencia en municipios con una población menor de 100.000 habitantes y una edad de más de 65 años (17), así como la endemia, la precipitación anual, la densidad poblacional y la circulación del serotipo 2, entre otros (18).

La mortalidad debida al dengue se considera evitable y su reducción depende principalmente de la detección precoz de los casos, el acceso oportuno a los servicios de salud y la calidad de la atención que se le proporcione a los afectados (19).

El dengue en Colombia es un importante problema de salud pública debido a las enormes pérdidas económicas (20,21) y humanas que provoca, especialmente cuando se presentan epidemias. En el país, 74 % de las cabeceras municipales están situadas por debajo de los 1.800 metros sobre el nivel del mar (msnm), y presentan condiciones climáticas, geográficas y epidemiológicas aptas para la transmisión de la enfermedad; de igual manera, se estima que cerca del 55 % de la población colombiana se encuentra en riesgo de enfermar o morir por esta causa.

En el país se han hecho diversas investigaciones sobre aspectos relacionados con esta enfermedad. Sin embargo, a pesar de su reaparición, no se conoce el comportamiento de la mortalidad por dengue debido a que son escasos los estudios epidemiológicos sobre el tema. En este contexto, el objetivo de este estudio fue describir el comportamiento de las defunciones debidas a dengue, entre 1985 y 2012.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio descriptivo para determinar el comportamiento de la mortalidad por dengue en Colombia entre 1985 y 2012. Los datos se obtuvieron de los registros de los certificados individuales de defunción consolidados en las bases de datos sobre mortalidad del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE).

Se analizaron las muertes codificadas como dengue de acuerdo con las normas de la Clasificación Internacional de Enfermedades (novena revisión para el periodo 1985-1996 y décima para el periodo 1997-2012) (22,23). La codificación de las defunciones para el periodo de estudio cambió al código 0610 en la novena revisión, y a los códigos A90 y A91 en la décima revisión; en general, el diagnóstico de dengue se conservó.

La información sobre la población entre 1985 y 2012 se obtuvo de las estimaciones y proyecciones producidas por el DANE (24).

Las variables consideradas fueron: año de registro de la defunción, población total por año, número de muertes, sexo, edad, categoría del municipio de residencia habitual, municipio de residencia

habitual y código de causa básica de defunción. La categoría del municipio empleada fue la señalada en la Ley 617 de 2000, la cual clasifica los municipios de acuerdo con el número de habitantes y los ingresos corrientes de libre destinación (cuadro 1) (25).

Se estimaron las tasas crudas de mortalidad por sexo y grupos de edad (0 a 4, 5 a 14, 15 a 44, 45 a 64, y 65 y más años). Las tasas se presentaron como muertes por 100.000 personas al año.

Para comparar la evolución de la mortalidad en el tiempo, se calcularon las tasas anuales ajustadas por edad desde 1985 hasta 2012 utilizando el método directo y tomando como población de referencia la población nacional por grupos de edad y por quinquenios del censo de 2005. Se calculó la letalidad anual de los casos de dengue a partir de la información de los registros de morbilidad consolidados por el programa de control de vectores del Ministerio de Salud y de la Protección Social para los años 1985 a 1997 y de la información del Sistema de Vigilancia de Salud Pública (Sivigila) del Instituto Nacional de Salud para los años 1998 a 2012. Se calcularon razones de tasas con su respectivo intervalo de confianza de 95 % para los periodos 1985-1994, 1995-2004 y 2005-2012, con el fin de comparar por grupos de edad y por categoría municipal.

La información sobre la circulación de los serotipos del virus de dengue se obtuvo de los consolidados del Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud.

Para el procesamiento de la información obtenida, se emplearon hojas de cálculo de Microsoft Excel®. La información se analizó con el programa Stata®, versión 12.

Esta investigación tuvo en cuenta los requisitos éticos establecidos en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, que en su artículo 11 establece que los estudios de este tipo son investigaciones "sin riesgo".

Resultados

Entre 1985 y 2012, se registraron 1.990 muertes por dengue en Colombia; 55,6 % (1.106) de los fallecimientos se presentó en hombres. El promedio de edad fue de 29,7 años para hombres y de 30,4 años para mujeres. La relación entre hombres y mujeres fue de 1,25:1. La tasa cruda de mortalidad para el periodo de estudio fue de 0,18 muertes por 100.000 habitantes (0,20 para hombres y 0,16

Cuadro 1. Clasificación de los municipios colombianos

Categoría municipal	Tamaño de la población municipal	Ingresos corrientes de libre destinación (SMLMV)
6	< 10.000	Hasta 15.000
5	10.001 - 20.000	> 15.000 - 25.000
4	20.001 - 30.000	> 25.000 - 30.000
3	30.001 - 50.000	> 30.000 - 50.000
2	50.001 - 100.000	> 50.000 - 100.000
1	100.001 - 500.000	>100.000 - 400.000
Especial	>500.000	>400.000

SMLMV: salarios mínimos legales mensuales vigentes

Fuente: Ley 615 de 2000

para mujeres). Durante este periodo, las tasas de mortalidad presentaron grandes variaciones que permitieron establecer dos patrones, uno entre 1985 y 1996, en el que las tasas oscilaron entre 0,0 y 0,05 muertes por 100.000 habitantes, y otro entre 1997 y 2012, en el que las tasas variaron entre 0,15 y 0,60 casos por 100.000 habitantes (figura 1). En este último periodo, las tasas de mortalidad más altas correspondieron a los años 1998, 2000-2001, 2006 y 2010. Por sexo, las tasas de mortalidad fueron más altas en hombres (cuadro 2). Se estimó que las tasas de mortalidad de los hombres correspondieron a 1,31 (IC_{95%} 1,20-1,43) veces las tasas de la mortalidad en las mujeres. Para los grupos de edad de 75 a 79 años, y 80 y más años, las tasas de mortalidad de los hombres fueron de 1,55 (IC_{95%} 1,21-1,99) y 2,87 (IC_{95%} 2,34-3,51) veces las tasas de mortalidad de las mujeres, respectivamente.

La letalidad por dengue para el periodo de estudio fue de 0,20 %; en el 2000 se presentó la más alta con 0,39 %. Entre 1985 y 2012, circularon en el país los cuatro serotipos del virus del dengue (cuadro 2).

Las tasas de mortalidad específicas por grupo de edad evidenciaron un panorama complejo debido a las amplias variaciones durante el periodo (figura 2). Las tasas más altas se registraron en el grupo de 65 y más años de edad durante todo el periodo. A partir de 1998, las tasas de los menores de 5 años también fueron altas (cuadro 3).

La razón de tasas por grupos de edad de todo el periodo indicó que los grupos de 65 y más años y de 0 a 4 años presentaron un riesgo que superó en 9,82 y 6,86 veces el del grupo de 45 a 64 años, respectivamente. Al comparar las tasas de mortalidad por grupos de edad de los periodos 1985-1994 y 2005-2012, se presentó un

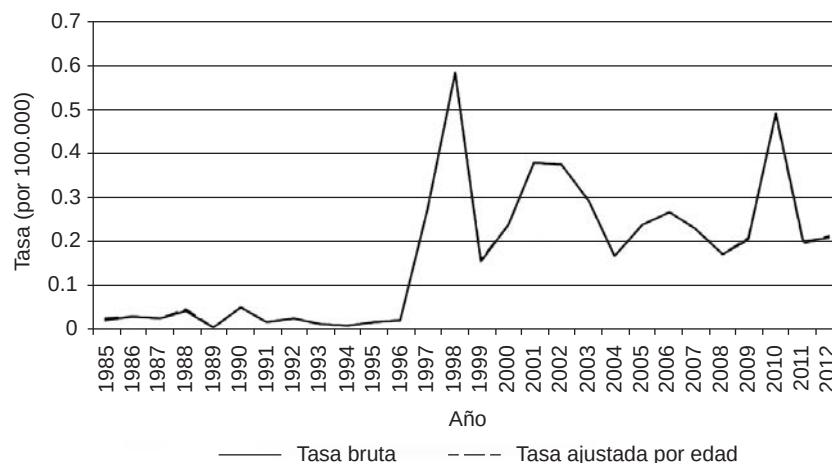


Figura 1. Tasas de mortalidad por dengue, Colombia, 1985-2012
Fuente: Estadísticas vitales, DANE

Cuadro 2. Tasas crudas de mortalidad por dengue según sexo, Colombia, 1985-2012

Año	Tasa de mortalidad		Letalidad	Serotipo circulante reportado*
	Hombre	Mujer		
1985	0,02	0,02		DENV 1, 2
1986	0,03	0,03		DENV 1, 2
1987	0,02	0,02		DENV 1, 2
1988	0,02	0,06		
1989	0,01	0,00		
1990	0,08	0,01	0,09	DENV 1, 2, 4
1991	0,00	0,03	0,03	
1992	0,03	0,01	0,04	DENV 2
1993	0,01	0,02	0,02	DENV 1, 2, 4
1994	0,01	0,00	0,01	
1995	0,02	0,01	0,01	DENV 1, 2, 4
1996	0,03	0,02	0,02	
1997	0,29	0,26	0,44	DENV 1, 2, 4
1998	0,65	0,55	0,37	DENV 1, 2
1999	0,19	0,11	0,28	
2000	0,30	0,19	0,39	
2001	0,45	0,31	0,25	DENV 1, 2, 4
2002	0,44	0,32	0,19	DENV 1, 3, 4
2003	0,34	0,26	0,21	DENV 1, 2, 3
2004	0,19	0,14	0,29	DENV 1, 2, 4
2005	0,25	0,23	0,24	DENV 1, 2, 3
2006	0,32	0,22	0,30	DENV 1, 2, 3, 4
2007	0,26	0,20	0,23	DENV 1, 2, 3, 4
2008	0,14	0,20	0,20	DENV 1, 2, 3, 4
2009	0,25	0,16	0,17	DENV 1, 2, 3, 4
2010	0,54	0,45	0,14	DENV 1, 2, 3, 4
2011	0,22	0,18	0,30	DENV 1, 2, 3, 4
2012	0,25	0,17	0,18	DENV 1, 2, 3, 4

Fuentes: Estadísticas vitales, DANE; Programa de control de vectores, Ministerio de Salud y Protección Social; Sivigila, Instituto Nacional de Salud; *Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Salud

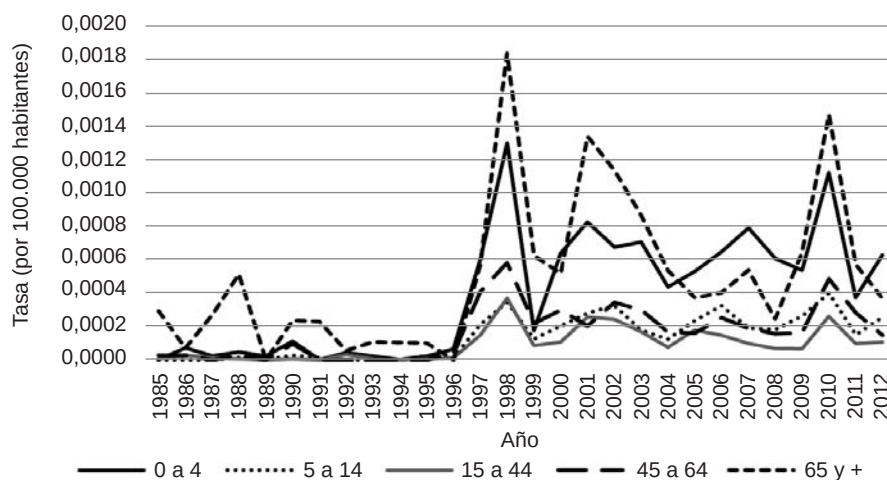
importante aumento en todos los grupos, el cual fue mayor en el de 5 a 14 años; al confrontar las tasas de mortalidad de los periodos 1995-2004 y

2005-2012, también se encontró un incremento en todos los grupos, aunque no tan acentuado como el encontrado para los periodos anteriores (cuadro 3). Las tasas de mortalidad por dengue más altas se hallaron en los municipios ubicados en la ribera del río Magdalena y, de forma aislada, en sectores de la Orinoquia, la Amazonia y la Costa Atlántica (figura 3).

La razón de tasas por categoría de municipio para el periodo 1985-1994 mostró que los municipios de categoría 3, 4 y 6 presentaron un riesgo de 8,10, 8,37 y 7,39 veces, respectivamente, en relación con los municipios de categoría especial. Para los periodos 1995-2004 y 2005-2012, la razón de tasas de los municipios de categorías 1 a 4 fue mayor que la de los municipios de categoría especial. Al comparar las tasas de mortalidad por categoría municipal entre los periodos 1985-1994 y 2005-2012, se registró un gran incremento en todas ellas, y el cambio más acentuado se dio en los municipios de categoría especial y en los de categorías 1 y 2. Al comparar las tasas de mortalidad de 1995 a 2004 y de 2005 a 2012, se encontró una disminución en todas las categorías de municipios, especialmente en los de categoría 1, 2 y 6 (cuadro 4).

Discusión

De acuerdo con los resultados de este estudio, las tasas de mortalidad por dengue en Colombia presentaron grandes variaciones y tendencia al incremento entre 1997 y 2012. En los hombres de los grupos de edad de menores de 5 años y de 65 y más años, las tasas de mortalidad fueron las más altas. Entre 1995 y 2012 los municipios de

**Figura 2.** Tasas de mortalidad por dengue según grupo de edad, Colombia, 1985-2012

Fuente: Estadísticas vitales, DANE

Cuadro 3. Tasas de mortalidad por dengue según grupo de edad, Colombia, 1985-2012

Periodo	Grupo de edad	Muertes	Población	Tasa de mortalidad	Razón de tasas	Intervalo de confianza de 95 %		Variación
						Inferior	Superior	
1985-1994	0 a 4	15	4'410.398	0,34	7,68	3,6	16,4	1985-1994 Vs. 2005-2012 1439,5
	5 a 14	4	4'222.096	0,09	2,14	0,64	7,10	2273,9
	15 a 44	15	7'721.940	0,19	4,39	1,93	9,96	1144,3
	45 a 64	7	15'804.837	0,04	1			1470,1
	65 y +	30	1'650.305	1,82	41,04	25,17	66,92	156,6
1995-2004	0 a 4	246	4'533.372	5,43	6,97	5,84	8,31	1995-2004 Vs. 2005-2012 108,8
	5 a 14	161	5'648.191	2,85	3,66	2,97	4,51	114,4
	15 a 44	278	8'759.959	3,17	4,07	3,39	4,90	93,5
	45 a 64	146	18'744.379	0,78	1			111,9
	65 y +	176	2'288.754	7,69	9,87	8,26	11,79	110,8
2005-2012	0 a 4	225	4'297.121	5,24	7,53	6,31	8,99	
	5 a 14	176	7'825.628	2,25	3,23	2,63	3,98	
	15 a 44	213	8'812.462	2,42	3,46	2,85	4,24	
	45 a 64	145	20'851.315	0,70	1			
	65 y +	137	2'936.907	4,66	6,71	5,48	8,21	
1985-2012	0 a 4	501	4'421.952	11,33	6,86	6,07	7,76	
	5 a 14	352	5'760.996	6,11	3,70	3,21	4,27	
	15 a 44	516	8'404.239	6,14	3,72	3,26	4,25	
	45 a 64	302	18'296.524	1,65	1			
	65 y +	364	2'245.923	16,21	9,82	8,68	11,11	

Fuente: Estadísticas vitales, proyecciones y estimaciones de población, 1985-2020, DANE

categoría 1 a 4 también presentaron las tasas más altas. La letalidad durante el periodo varió entre 0,01 y 0,39 %.

Las variaciones de las tasas de mortalidad registradas probablemente sean el resultado de la confluencia de varios factores, entre los que se cuentan el comportamiento de esta enfermedad en el contexto latinoamericano, las distintas medidas

adoptadas por los programas regional y nacional para la prevención y el control de la enfermedad, y la dinámica de la transmisión del virus.

Durante el siglo pasado, en la década de los años ochenta, la falta de sostenimiento y el abandono de los programas de control y erradicación de *A. aegypti* condujeron a la reinfestación de la mayoría de los países de la región de las Américas (26). En

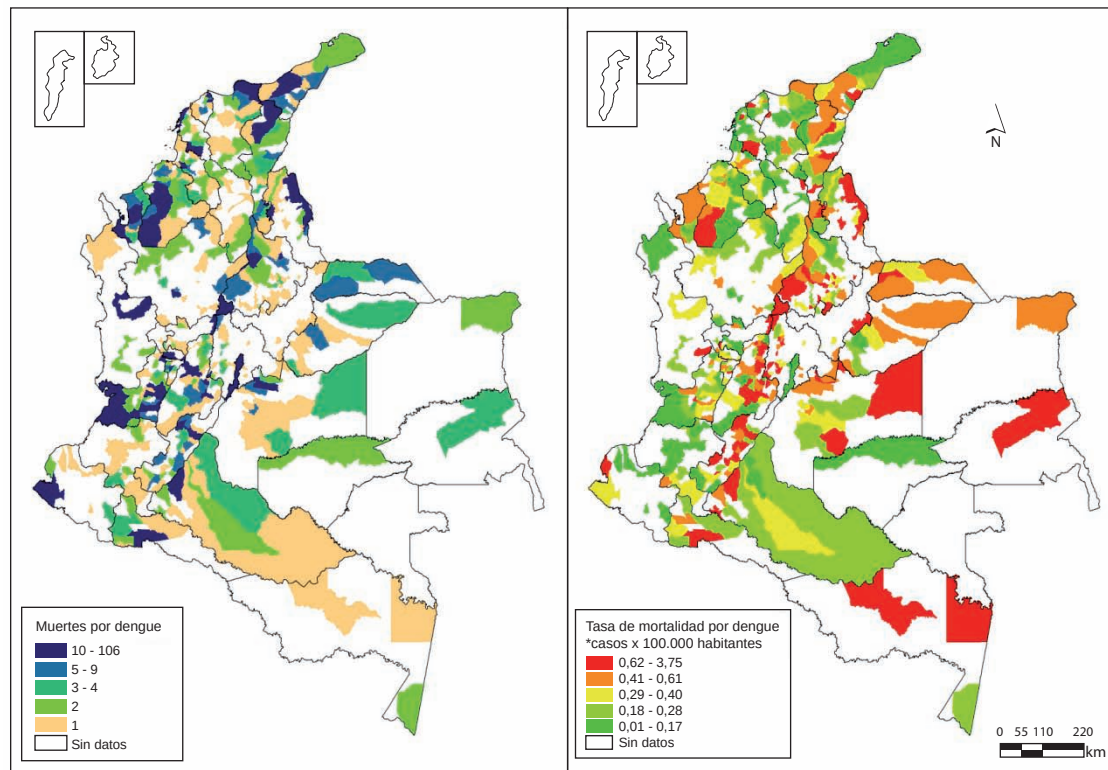


Figura 3. Mortalidad por dengue por municipios, Colombia, 1985-2012

Fuente: Estadísticas vitales, proyecciones y estimaciones de población, 1985-2020, DANE

Cuadro 4. Tasas de mortalidad por dengue según clasificación municipal, Colombia, 1985-2012

Periodo	Categoría municipal	Población municipal	Muertes	Población	Tasa de mortalidad	Razón de tasas	Intervalo de confianza de 95 %		Variación
							Inferior	Superior	
									1985-1994 Vs 2005-2012
1985-1994	6	<10.000	7	2'035.146	0,34	7,39	2,78	19,63	460,5
	5	10.001 - 20.000	7	4'144.146	0,17	3,63	1,24	10,60	934,3
	4	20.001 - 30.000	12	3'079.870	0,39	8,37	3,51	19,99	486,3
	3	30.001 - 50.000	13	3'448.816	0,38	8,10	3,41	19,24	598,1
	2	50.001 - 100.000	7	3'178.709	0,22	4,73	1,67	13,39	1439,9
	1	100.001 - 500.000	19	7'176.260	0,26	5,69	2,38	13,60	1409,1
	Especial	>500.000	5	10'746.628	0,05	1			3353,9
									1995-2004 Vs. 2005-2012
1995-2004	6	<10.000	46	2'385.860	1,93	1,20	0,87	1,65	-32,6
	5	10.001 - 20.000	77	4'407.306	1,75	1,08	0,84	1,41	-3,5
	4	20.001 - 30.000	75	3'283.345	2,28	1,42	1,09	1,85	-6,6
	3	30.001 - 50.000	100	3'799.978	2,63	1,64	1,29	2,07	0,5
	2	50.001 - 100.000	130	3'833.692	3,39	2,11	1,71	2,61	-26,0
	1	100.001 - 500.000	360	9'009.804	4,00	2,47	2,11	2,93	-31,4
	Especial	>500.000	213	13'254.670	1,61	1			-18,8
2005-2012	6	<10.000	34	2'616.696	1,30	0,99	0,69	1,43	
	5	10.001 - 20.000	78	4'626.864	1,69	1,29	0,99	1,68	
	4	20.001 - 30.000	76	3'562.125	2,13	1,64	1,26	2,13	
	3	30.001 - 50.000	109	4'120.929	2,65	2,03	1,61	2,55	
	2	50.001 - 100.000	110	4'381.248	2,51	1,93	1,53	2,42	
	1	100.001 - 500.000	287	10'463.497	2,74	2,10	1,76	2,51	
	Especial	>500.000	195	14'952.074	1,30	1			

Fuente: Estadísticas vitales, proyecciones y estimaciones de población, 1985-2020, DANE; Ley 615 de 2000

la década de los noventa, a pesar de la exhortación al fortalecimiento de los programas nacionales y locales de prevención y lucha contra el dengue, se presentaron epidemias que afectaron a la mayoría de los países de la región, las cuales coincidieron con la circulación de todos los serotipos de dengue. En los albores del actual siglo, se adoptó en los países de la región de las Américas la Estrategia de Gestión Integrada para la Prevención y el Control del Dengue (EGI-Dengue) como medida para la prevención y el control de la enfermedad (27).

La dinámica de transmisión del virus, que obedece a la interacción entre el ambiente, el agente, la población de huéspedes y el vector, aunada a los distintos contextos sociales, culturales, económicos y políticos de las áreas donde la enfermedad se presenta, fue la responsable de las epidemias de los años 1987, 1990, 1993, 1995, 1998, 2002 y 2010, de las cuales la pandemia de 1998 produjo el más alto número de muertes que se haya registrado en el país.

En los tres periodos analizados, los municipios con diferente nivel de desarrollo presentaron, en general, tasas de mortalidad más altas que los municipios de categoría especial; sin embargo, la razón de las tasas de mortalidad fue estadísticamente significativa para los municipios de categorías 1 a 4 en los periodos 1995-2004 y 2005-2012. Es posible que en los municipios de categorías 1 a 3 las actividades de prevención y control de vectores, a cargo del nivel municipal, no fueran suficientes, pero en los de categoría 4, en los cuales esta responsabilidad es de competencia del nivel departamental, tampoco resultó efectiva (28).

Independientemente de la categoría del municipio, la gran mayoría experimentó un crecimiento de la población, y se vio afectada por la migración del campo a la ciudad y por la urbanización no planificada, a lo cual hay que añadir la insuficiente infraestructura urbana básica, las viviendas con condiciones deficientes, y la falta de un adecuado suministro de servicios como agua, alcantarillado y recolección de basuras (29,30). Por otra parte, la proliferación masiva de productos no reciclables, como plásticos no retornables, envases y neumáticos, condujo a un deterioro del medio ambiente que favoreció el aumento de los criaderos de mosquitos (31).

Si a estos factores se suman el incremento de la migración de individuos a áreas endémicas para el dengue, el deterioro de las medidas de

prevención y control del vector, y los limitados recursos económicos y humanos destinados a las actividades de salud pública, se comprende la razón por la cual el dengue se estableció como una enfermedad persistente en la población colombiana (3).

Se evidenciaron mayores tasas de mortalidad por dengue en los municipios con menor densidad poblacional y menores ingresos económicos (municipios de categoría 6) que en los municipios con mayor densidad poblacional y mayores ingresos económicos (municipios de categoría especial). La Ley 715 del 2001 estableció como competencias de los departamentos del país la implementación de las acciones de control de vectores en los municipios de categorías 4, 5 y 6 de su jurisdicción, y como competencias de los distritos y municipios de categoría especial, y de categorías 1, 2 y 3, la formulación y la ejecución de las acciones de promoción, prevención, vigilancia y control de vectores (28). Con estas disposiciones es posible que se hayan debilitado las actividades de control habitual en los municipios de categoría 6 debido a que los departamentos redujeron sus actividades en este campo. Es probable que estos últimos municipios no contaran con los recursos humanos, físicos y financieros para asumir las responsabilidades, lo cual también se ha evidenciado en los procesos de reforma y descentralización implementados en América Latina (32).

Se considera que la calidad de la atención médica, el acceso oportuno a los servicios de salud, la promoción y la prevención son elementos básicos para reducir la mortalidad por dengue (19). En Colombia, la reforma y la descentralización separaron estas actividades, de manera que las de promoción y prevención quedaron a cargo de las secretarías locales de salud, y las de diagnóstico y tratamiento, en manos de las aseguradoras y las instituciones prestadoras de servicios de salud.

Otros factores que también han podido contribuir al aumento de la mortalidad son la ocupación, la pobreza, el analfabetismo, los conocimientos y las prácticas de la comunidad en relación con la enfermedad, la desnutrición, la falta de acceso al diagnóstico y la disponibilidad y la oportunidad de tratamiento, y la capacidad y calidad de los mismos servicios de salud (33). Entre las prácticas inadecuadas relacionadas con las medidas preventivas y de control de la enfermedad, figura el almacenamiento de agua, una práctica común

que, independientemente de la condición socio-económica de la población, se da como respuesta a las interrupciones del suministro y a su precio elevado en algunos lugares (34).

Las tasas de mortalidad por grupo de edad fueron más altas entre los menores de 5 años y mayores de 64 años. Patrones similares se han reportado en México (35) y Tailandia, aunque en periodos diferentes (36,37). En los grupos de más edad, el riesgo de morir aumenta y probablemente está asociado con el incremento del número de enfermedades concomitantes y con una mayor propensión a contraer infecciones en general (38,39); también se ha aducido la transición demográfica (40).

Los hallazgos de este estudio tienen implicaciones para las estrategias de prevención y control del dengue. El modelo de gestión EGI-Dengue tiene como objetivo fortalecer los programas nacionales para reducir la morbilidad, la mortalidad, y la carga social y económica que produce el dengue. Sin embargo, se han señalado problemas y debilidades relacionados con la gerencia del programa, con la vigilancia epidemiológica y entomológica y el control del vector, con la atención de los pacientes y el servicio de laboratorio, y con la comunicación social, aspectos que deben ser revisados y corregidos.

Otros factores que pueden explicar la muerte debida a dengue son los que tienen que ver con las prácticas clínicas en la atención de los pacientes, principalmente los relacionados con la atención en la primera consulta, en la que el diagnóstico puede pasar desapercibido, así como con el uso de pruebas inapropiadas y la interpretación de sus resultados (6).

Los resultados que se presentan deben interpretarse con precaución debido a que provienen de una fuente de información secundaria, lo cual implica limitaciones en la calidad de los datos (cobertura y contenido), así como en su completitud y validación. En relación con la cobertura, el subregistro puede ser consecuencia de las dificultades para determinar la causa exacta de la muerte. La causa básica de defunción podría quedar enmascarada por una inadecuada elaboración de las causas en el certificado de defunción, debido a que se pueden registrar los eventos derivados de las complicaciones que produce el dengue o las enfermedades que se consideran en su diagnóstico diferencial (41). Igualmente, es posible que al establecer la causa

del fallecimiento no se tenga en cuenta la definición de muerte por dengue establecida en el protocolo de vigilancia en salud pública desde la década pasada (42). A pesar de que en los últimos años la vigilancia de esta enfermedad ha incorporado el análisis de los casos de muerte, aún falta comparar y validar la información recopilada en los certificados de defunción correspondientes a defunciones por dengue.

Por otra parte, puede haber dificultades para el cálculo preciso de las tasas de mortalidad relacionadas con problemas que afectan el numerador o el denominador. El numerador puede verse influido por el subregistro en las defunciones, en tanto que el denominador puede verse afectado por la población considerada para la estimación, ya sea la población total o la población en riesgo. En este estudio se utilizó la primera, con lo cual pudo haberse diluido la magnitud de la enfermedad. La población en riesgo es difícil de establecer si se tiene en cuenta la altitud de los municipios considerados endémicos, así como el vector.

A pesar de las limitaciones, en este estudio se analizó el comportamiento de la tendencia de la mortalidad por dengue y puede ser la base para llevar a cabo investigaciones que utilicen otras metodologías y que permitan ampliar el conocimiento sobre la mortalidad por dengue en la población colombiana en riesgo.

En conclusión, el dengue es una enfermedad evitable que debería desaparecer de las estadísticas de mortalidad como causa de defunción. La muerte puede evitarse en la medida en que se implementen y evalúen las actividades propuestas en la EGI-Dengue, como la vigilancia epidemiológica; la implementación de prácticas eficaces para el diagnóstico del dengue en las redes de laboratorios; la vigilancia y el control de los vectores; el manejo clínico de los pacientes, y la comunicación y la movilización social (27).

Asimismo, se recomienda impulsar el desarrollo de una cultura informática entre los responsables de la vigilancia en salud pública, la cual deberá incorporar las estadísticas vitales y la información del programa de prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores, con el fin de conocer en tiempo real los casos de mortalidad con base en el certificado de defunción y de que se mejore la calidad de los datos que se consignan. Aunque aún hay retrasos y limitaciones en la consolidación nacional de la información proveniente de los certificados de defunción, estos son la principal

fuentes de información sobre la mortalidad y contribuyen a la adopción de decisiones y a priorizar la utilización de los recursos asignados.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Financiación

Este trabajo se hizo con los recursos de funcionamiento del Observatorio Nacional de Salud del Instituto Nacional de Salud.

Referencias

1. **Lemos G.** Dengue, un problema social reemergente en América Latina. Estrategia para su erradicación. *Biotechnología Aplicada*. 2006;23:130-6.
2. **Guzmán MG, Kouri G.** Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Lessons and challenges. *J Clin Virol*. 2003;27:1-13.
3. **Gubler DJ.** Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*. 2002;10:100-3. [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02288-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02288-0)
4. **Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen vV, Wills B.** Dengue. *N Engl J Med* 2012;366:1423-32 <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMr1110265>
5. **Endy TP, Anderson KB, Nisalak A, Yoon IK, Green S, Rothman AL, et al.** Determinants of inapparent and symptomatic dengue infection in a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5:e975. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000975>
6. **World Health Organization (WHO).** Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: New edition. WHO: Geneva; 2009.
7. **Bhatt S, Gething P, Brady O, Messina J, Farlow A, Moyes C, et al.** The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013;496:504-7 <http://dx.doi.org/10.1038/nature12060>
8. **Murray C, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman A, Michaud C, et al.** Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2197-223 [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61689-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61689-4)
9. **Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al.** Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1760. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760>
10. **World Health Organization.** Dengue and severe dengue (Fact sheet N117). Fecha de consulta: 15 de abril de 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
11. **Centers for Disease Control and Prevention.** Dengue Homepage. Fecha de consulta: 1º de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.cdc.gov/Dengue/>
12. **World Health Organization.** Dengue hemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control. Second edition. Geneva: World Health Organization; 1997. p. 84.
13. **Ganguly A, Malabadi RB, Bhatnagar PK, Tang X, Das D, Loebenberg R, et al.** Production and characterization of monospecific and bispecific antibodies against dengue virus NS1 protein. *J Virol Methods*. 2015;220:5-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.04.004>
14. **World Health Organization.** Handbook for clinical management of dengue. Geneva: World Health Organization; 2012. p. 111.
15. **Ministério da Saúde.** Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança. 4th edition. Brasília: Ministério da Saúde; 2013. p. 80.
16. **Karunakaran A, Ilyas WM, Sheen S, Jose N, Nujum Z.** Risk factors of mortality among dengue patients admitted to a tertiary care setting in Kerala, India. *J Infect Public Health*. 2014;7:114-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2013.09.006>
17. **Campos KB, Amâncio FF, de Araújo VE, Carneiro M.** Factors associated with death from dengue in the state of Minas Gerais, Brazil: Historical cohort study. *Trop Med Int Health*. 2015;20:211-8. <http://dx.doi.org/10.1111/tmi.12425>
18. **Díaz-Quijano FA, Waldman EA.** Factors associated with dengue mortality in Latin America and the Caribbean, 1995–2009: An ecological study. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86:328-34. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0074>
19. **Martínez E.** La prevención de la mortalidad por dengue: un espacio y un reto para la atención primaria de salud. *Rev Panam Salud Pública*. 2006;20:60-74. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892006000700013>
20. **Shepard D, Coudeville L, Halasa Y, Zambrano B, Dayan G.** Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84:200-7. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0503>
21. **Castañeda-Orjuela C, Díaz H, Álviz-Guzmán N, Olarte A, Rodríguez H, Camargo G, et al.** Burden of disease and economic impact of dengue and severe dengue in Colombia, 2011. *Value Health Reg Issues*. 2012;1:123-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vhri.2012.09.014>
22. **Organización Panamericana de la Salud.** Manual de la clasificación estadística internacional de enfermedades, traumatismos y causas de defunción. Novena revisión. Washington, D.C.: OPS; 1978.
23. **Organización Panamericana de la Salud.** Clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud. Décima revisión. Washington, D.C.: OPS; 1995.
24. **Departamento Administrativo Nacional de Estadística.** Estimaciones 1985-2005 y proyecciones 2005-2020 nacional y departamental desagregadas por sexo, área y grupos quinquenales de edad. Fecha de consulta: 10 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.dane.gov.co/index.php/poblacion-y-demografia/proyecciones-de-poblacion>
25. **Ministerio de Hacienda y Crédito Público.** Ley 617 de 2000. Fecha de consulta: 30 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.minhacienda.gov.co/portal/page/portal/HomeMinhacienda/asistenciaentidadesterritoriales/Publicaciones/Libros/Ley%20617%20de%202000%20version%202008.pdf>

26. **Organización Panamericana de la Salud.** Plan continental de ampliación e intensificación del combate al *Aedes aegypti*. Rev Panam Salud Pública. 1998;3:124-30. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49891998000200014>
27. **Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud.** Últimos adelantos técnicos en la prevención y el control del dengue en la Región de las Américas. Informe de reunión. Washington. 2014. Fecha de consulta: 24 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.slamviweb.org/es/home/dengue/2014-cha-adelantos-prevencion-americas-dengue.pdf>
28. **Ministerio de Hacienda y Crédito Público.** Ley 715 de 2001. Por la cual se dictan normas orgánicas en materia de recursos y competencias de conformidad con los artículos 151,288, 356 y 357 de la Constitución Política y se dictan otras disposiciones para organizar la prestación de los servicios de educación y salud, entre otros. Bogotá D.C.: Congreso de la República; 2001. Fecha de consulta: 30 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.minhacienda.gov.co/portal/page/portal/HomeMinhacienda/presupuestogeneraldeplanacion/Normativapresupuesto/Leyes/Ley%20715%20de%20diciembre%2021%20de%202001>
29. **Barrera R, Ávila J, González S.** Unreliable water supply of potable water and elevated *Aedes aegypti* larval indices: A causal relationship. J Am Mosq Control Assoc. 1993;9: 189-95.
30. **Toan DT, Hoat LN, Hu W, Wright P, Martens P.** Risk factors associated with an outbreak of dengue fever/dengue haemorrhagic fever in Hanoi, Vietnam. Epidemiol Infect. 2015; 143:1594-8. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268814002647>
31. **Gómez-Dantés H, Willoquet J.** Dengue in the Americas: Challenges for prevention and control. Cad Saúde Pública. 2009;25:S19-31. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2009001300003>
32. **Barón G.** Cuentas de salud de Colombia 1993-2003: el gasto nacional en salud y su financiamiento. Bogotá: Ladiprint Editorial Ltda.; 2007. p. 155.
33. **Starfield B.** Atenção primária: equilíbrio entre necessidades de saúde, serviços e tecnologia. Brasília: UNESCO, Ministério de Saúde; 2002.
34. **García-Betancourt T, Higuera-Mendieta D, González-Uribe C, Cortés S, Quintero J.** Understanding water storage practices of urban residents of an endemic dengue area in Colombia: Perceptions, rationale and socio-demographic characteristics. PLoS One. 2015;10:e0129054. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0129054>
35. **Gaxiola-Robles R, Celis A, Serrano-Pinto V, Orozco-Valerio M, Zenteno-Savín T.** Mortality trend by dengue in México 1980 to 2009. Revista de Investigación Clínica. 2012;64:444-51.
36. **Kongsomboon K, Singhasivanon P, Kaewkungwal J, Nimmannitya S, Mammen MP Jr, Nisalak A, et al.** Temporal trends of dengue fever/dengue hemorrhagic fever in Bangkok, Thailand, from 1981 to 2000: An age-period-cohort analysis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2004;35:913-7.
37. **Halstead S.** More dengue, more questions. Emerg Infect Dis. 2005;11:740-1. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1105.050346> PMID: PMC3320355
38. **García-Riveira EJ, Rigau-Pérez JG.** Dengue severity in elderly in Puerto Rico. Rev Panam Salud Pública. 2003;13: 362-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892003000500004>
39. **Lee IK, Liu JW, Yang KD.** Clinical and laboratory characteristics and risk factors for fatality in elderly patients with dengue hemorrhagic fever. Am J Trop Med Hyg. 2008;79:149-53.
40. **Guha-Sapir D, Schimmer B.** Dengue fever: New paradigms for a changing epidemiology. Emerg Themes Epidemiol. 2005;2:1. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-7622-2-1>
41. **Arbo A, Basualdo W, Bogado N, Iramain R, Lovera D, Pavlicih V.** Manejo de casos de dengue durante epidemias. Pediatr (Asunción). 2011;38:57-62.
42. **Instituto Nacional de Salud.** Dengue. Protocolo de vigilancia en salud pública. 2014. Fecha de consulta: 30 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Dengue.pdf>

ARTÍCULO ORIGINAL

Evidencia de circulación del virus de la hepatitis A, subgenotipo IA, en muestras ambientales en Antioquia, Colombia

Paula Andrea Báez¹, Carlos Mario Jaramillo¹, Lina Arismendi², Julio César Rendón¹,
Fabián Cortés-Mancera^{1,3}, Dioselina Peláez⁴, María Mercedes González⁵,
Francisco Molina², María Cristina Navas¹

¹ Grupo de Gastrohepatología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental-GAIA, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

³ Grupo de Investigación e Innovación Biomédica GI²B, Instituto Tecnológico Metropolitano, Medellín, Colombia

⁴ Grupo de Virología, Dirección Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C, Colombia

⁵ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Introducción. El virus de la hepatitis A (HAV) es un importante patógeno que se transmite por vía fecal-oral. La epidemiología de la infección está directamente relacionada con el acceso de la población al agua potable y con la infraestructura de alcantarillado.

Objetivo. Determinar la presencia del HAV e identificar el genotipo en muestras de agua de abastecimiento y agua residual en ocho municipios, un corregimiento y una vereda del departamento de Antioquia, noroccidente de Colombia.

Materiales y métodos. Se hicieron tres muestreos seriados de diciembre de 2012 a abril de 2014 en la fuente principal de abastecimiento de los acueductos y en el principal vertimiento de aguas residuales de cada municipio. Las muestras se concentraron por filtración y ultrafiltración tangencial, y por las técnicas de polietilenglicol y floculación con leche descremada, respectivamente. A partir del ARN total de cada muestra, se amplificaron la región VP3-VP1 para la detección del genoma viral y la región VP1-2B para la genotipificación.

Resultados. El genoma del HAV se detectó en las fuentes de agua de abastecimiento de Puerto Berrío, Frontino y Nutibara, y en las muestras de aguas residuales provenientes de los municipios de Arboletes, Zaragoza y Venecia. Mediante el análisis de las secuencias se identificó el subgenotipo IA del virus.

Conclusión. Este estudio permitió detectar la presencia del HAV en 6,6 % de las muestras de agua de abastecimiento y en 13,3 % de las muestras de agua residual de los municipios en estudio. Se reporta por primera vez la circulación del subgenotipo IA en muestras ambientales en Antioquia.

Palabras clave: virus de la hepatitis, agua potable, aguas residuales, salud pública, genotipo, filogenia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2979>

Evidence of the circulation of hepatitis A virus, subgenotype IA, in environmental samples from Antioquia, Colombia

Introduction: Hepatitis A virus (HAV) is an important pathogen, typically transmitted via the faecal-oral route. The epidemiology of the infection is directly related to drinking water access and adequate disposal of sewage water.

Objective: To determine the presence and identify the genotype of HAV in environmental samples from eight municipalities and two villages in Antioquia, northwestern Colombia.

Materials and methods: Three serial samplings were done between December, 2012, and April, 2014. Water samples were obtained from drinking water plants prior to treatment, as well as from the main

Contribución de los autores:

Julio César Rendón: diseño del estudio

Paula Andrea Báez: muestreos y recolección de los datos, protocolos de concentración de partículas virales, ensayos moleculares y análisis filogenético, análisis e interpretación de los datos, discusión de resultados, redacción del manuscrito

Carlos Mario Jaramillo: muestreos y recolección de los datos, protocolos de concentración de partículas virales

Francisco Molina y María Cristina Navas: diseño del estudio, muestreos y recolección de los datos, análisis e interpretación de los datos, discusión de resultados, redacción del manuscrito

Lina Arismendi: muestreos y recolección de los datos

María Mercedes González y Dioselina Peláez: protocolos de concentración de partículas virales

Fabián Cortés-Mancera: análisis e interpretación de los datos, discusión de resultados

reserve of wastewater in each municipality included in the study. Viral concentrations for the two types of sample sources were determined by filtration/tangential ultrafiltration and polyethyleneglycol plus flocculation with skimmed milk, respectively. Total ARN was subsequently obtained from each sample and the VP3-VP1 region amplified for detection of the viral genome. The genotype was determined by amplification of the VP1-2B region.

Results: The HAV genome was detected in samples from drinking water plants at Puerto Berrío, Frontino and Nutibara, and in wastewater samples from the municipalities of Arboletes, Zaragoza and Venecia. HAV subgenotype IA was identified using phylogenetic analysis.

Conclusion: In this study, HAV was identified in 6.6% of the samples from drinking water plants and 13.3% of wastewater samples. This is the first report of HAV subgenotype IA circulating in environmental samples from Antioquia.

Key words: Hepatitis viruses, drinking water, waste water, public health, genotype, phylogeny.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2979>

El virus de la hepatitis A (HAV) pertenece a la familia Picornaviridae, género *Hepatovirus*. El genoma viral está compuesto por ARN de cadena sencilla, de polaridad positiva y de 7,5 kb, aproximadamente (1). La partícula viral es de simetría icosaédrica y no posee envoltura lipídica (2), aunque recientemente se ha descrito una forma transitoria de la partícula embebida en una bicapa lipídica que le permitiría evadir la neutralización mediada por anticuerpos, facilitando su tránsito entre el hepatocito y el sistema biliar (3).

El HAV se encuentra clasificado en seis genotipos (I-VI) y seis subgenotipos (IA, IB, IIA, IIB, IIIA y IIIB), con un porcentaje de variabilidad de 15 y 7 %, respectivamente (4-8). Los genotipos I, II y III se han aislado principalmente de humanos (5,9) y, los genotipos IV, V y VI, de primates (4,6, 10,11). El genotipo I se encuentra distribuido a nivel mundial; el subgenotipo IA es prevalente en Europa occidental y en América (5,12), y comprende la mayoría de cepas estudiadas aisladas de humanos, así como de muestras ambientales (13-16).

El HAV se transmite principalmente por vía fecal-oral mediante el consumo de agua o alimentos contaminados (8,17). En el medioambiente, la partícula viral conserva su capacidad infecciosa durante periodos prolongados (8), lo cual facilita la dispersión del virus en fuentes de agua.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el mundo se presentan, aproximadamente, 1,4 millones de infecciones al año, aunque la tasa

de infección es probablemente 10 veces mayor si se consideran los casos sin ictericia y los casos asintomáticos (18,19). Según un reciente informe del peso de las enfermedades causadas por alimentos contaminados, el HAV fue el agente en más de 13 millones de casos de hepatitis viral y el causante de más de 27.000 muertes en 2010 en el mundo (20). La situación epidemiológica de América Latina es difícil de estimar por el subregistro, y por la diferencia en los patrones epidemiológicos y en los programas de vigilancia entre los países. Esta región presentaba un patrón de alta endemia hasta la década de los 90, pero gracias a las políticas de salud pública, el acceso al agua potable, el sistema de alcantarillado y las prácticas de higiene personal, dicho patrón cambió a endemia intermedia (19,21), el cual se documentó en la mayoría de los países latinoamericanos, incluido Colombia (21).

La introducción de la vacuna en países de la región, como Argentina, Brasil y Chile, ha tenido un gran impacto en la morbilidad de la infección por HAV (19,22-24). En el caso de Argentina, la vacuna se introdujo en el 2005 y desde el 2006 se ha podido observar una reducción de 88,1 % en la incidencia de la infección por HAV, tanto así que desde marzo de 2007 no se registran casos de falla hepática aguda ni trasplantes de hígado en pacientes con hepatitis A (22,23). En Colombia, el programa de vacunación contra el HAV se inició en el 2013; la vacuna se administra en una dosis única a los doce meses de edad (25).

Según los datos del Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) de Colombia, a partir del 2008 se ha observado un descenso significativo a nivel nacional de los casos de hepatitis A, probablemente gracias a mejoras en los sistemas de saneamiento y disposición de residuos (8,26). En ese año se notificaron 8.981 casos de hepatitis A en el territorio nacional, en el 2009, 6.708 casos,

Correspondencia:

María Cristina Navas, Grupo de Gastrohepatología, Universidad de Antioquia, Universidad de Antioquia, Calle 70 N° 52-21, Medellín, Colombia

Teléfono: (574) 219 6573; fax: (574) 219 6565

maria.navas@udea.edu.co

Recibido: 17/07/15; aceptado: 16/02/16

en el 2010, 5.064 casos, en el 2011, 5.573, en el 2012, 5.339 casos, en el 2013, 4.807 casos y en el 2014, 2.901 casos. En el 2014, 390 de los casos se reportaron en Antioquia, lo cual lo ubica como el departamento con el mayor número de casos (8,26-28).

La identificación y la caracterización del virus en la fuente principal de abastecimiento de los acueductos y en las aguas residuales aportan información importante sobre su circulación en la comunidad y determina el riesgo de brotes en el caso de las poblaciones que no cuentan con planta de potabilización. Según un estudio realizado por el Instituto Nacional de Salud en muestras de agua para consumo humano durante brotes de hepatitis A, entre el 2008 y el 2013, el genoma del HAV se detectó en 38,7 % de las muestras analizadas. Las muestras de agua se recolectaron en 52 municipios del territorio nacional y, de ellas, 23,6 % correspondía a muestras de agua tratada y 64,7 % a agua no tratada (29).

El presente estudio tuvo como fin determinar la presencia del HAV e identificar el genotipo en muestras de la fuente principal de abastecimiento de los acueductos y en el agua residual de nueve municipios y un corregimiento en las nueve subregiones del departamento de Antioquia.

Materiales y métodos

Tipo de estudio

Se hizo un estudio de tipo descriptivo, transversal, en las fuentes de abastecimiento del acueducto y en los sitios finales de descarga de

aguas residuales de ocho cabeceras municipales, un corregimiento y una vereda del departamento de Antioquia.

Selección de municipios

Los municipios del estudio corresponden a aquellos de cada subregión del departamento con la mayor tasa de incidencia de hepatitis A entre 2006 y 2009, según los indicadores básicos de la Dirección Seccional de Salud de Antioquia (30) (cuadro1).

Se incluyeron ocho municipios (Arboletes, Cisneros, Frontino, Granada, Puerto Berrío, San Pedro de los Milagros, Venecia y Zaragoza), un corregimiento (Nutibara en Frontino) y una vereda (San Andrés en Girardota), ubicados en las nueve subregiones del departamento (figura 1). En el municipio de Girardota se acordó obtener las muestras en la vereda San Andrés, dado que la cabecera municipal es abastecida por el acueducto de Medellín. Además de la cabecera municipal, en el municipio de Frontino también se incluyó el corregimiento de Nutibara, pues según la Secretaría de Salud de Frontino, la mayoría de casos notificados provienen de allí (31). El proyecto fue aprobado por las autoridades locales de cada población y por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.

Recolección de muestras ambientales y condiciones de pluviosidad

Se hicieron tres muestreos seriados desde diciembre de 2012 hasta abril de 2014, y se consideraron las condiciones de pluviosidad a lo largo del

Cuadro 1. Incidencia promedio de la hepatitis A en el periodo 2006 a 2009 y sistemas de tratamiento de aguas de los municipios incluidos en el estudio

Subregión del departamento de Antioquia	Municipio	Población municipal 2009 (32)	Promedio de la incidencia de hepatitis A (2006 a 2009, tasa por 100.000 habitantes) (32)	PTAP	PTAR
Occidente	Frontino	18.583	77,6	Sí	Laguna de oxidación
	(corregimiento Nutibara)	887*	Sin dato	No	No
Norte	San Pedro de los Milagros	23.855	73,5	Sí	Sí
Oriente	Granada	9.818	66,2	Sí	Sí
Suroeste	Venecia	13.365	39,1	Sí	Sí
Urabá	Arboletes	34.293	37,6	Sí	Laguna de oxidación
Valle de Aburrá	Girardota	47.055	26,8	No	Sí
	(vereda San Andrés)				
Bajo Cauca	Zaragoza	28.477	25,1	Sí	No
Magdalena Medio	Puerto Berrío	42.038	21,4	Sí	Laguna de oxidación
Nordeste	Cisneros	9.439	10,4	No	No

PTAP: punto de entrada a la planta de potabilización; PTAR: planta de tratamiento de agua residual

*Según el censo de 2005

año. En el cuadro 2 se presentan los datos de las precipitaciones registrados por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales

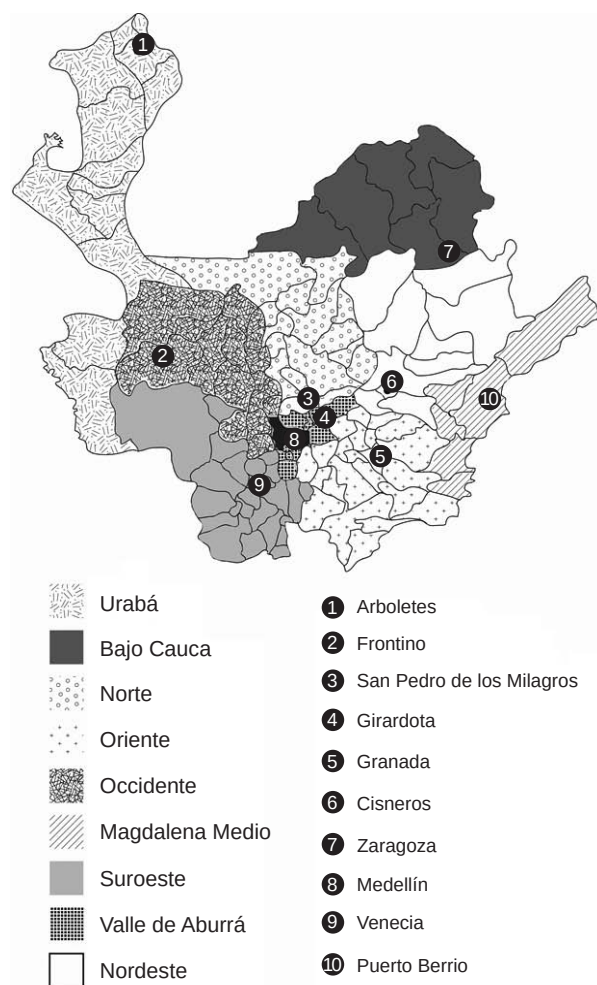


Figura 1. Subregiones del departamento de Antioquia y localización de los municipios incluidos en el estudio

(IDEAM) y los datos cualitativos suministrados por el personal del acueducto de cada población durante los muestreos. Durante el trabajo de campo, se obtuvo información de la infraestructura de las plantas de tratamiento de agua potable y de las plantas de aguas residuales existentes.

El primer muestreo se hizo entre diciembre de 2012 y mayo de 2013, periodo durante el cual se presentaron lloviznas leves y aisladas, en contraste con las fuertes y constantes precipitaciones que ocurrieron durante el segundo muestreo llevado a cabo entre septiembre y noviembre de 2013. Durante el tercer muestreo, entre diciembre de 2013 y abril de 2014, se presentaron lluvias leves y esporádicas.

La muestra de agua de la fuente principal de abastecimiento de los acueductos se tomó en el punto de entrada a la planta de potabilización, antes de someterse a cualquier tipo de tratamiento. En las poblaciones que no disponían de dicha planta, la muestra se recolectó antes del punto de distribución a las viviendas. En ambas circunstancias se recolectaron cinco litros de agua por muestra.

Las muestras de agua residual se obtuvieron en el punto de entrada a las plantas de tratamiento de agua residual, antes de iniciar el tratamiento. En los municipios que no poseían la infraestructura para el tratamiento de aguas residuales, la muestra se recolectó en el sitio final de descarga del efluente cloacal. En ambos casos se tomaron dos litros de agua en cada muestra.

Las muestras se recolectaron en recipientes plásticos limpios y nuevos, que se marcaron, se sellaron y se transportaron en cadena de frío hasta el Laboratorio de Gastrohepatología de la

Cuadro 2. Precipitación pluvial en los municipios durante el periodo de estudio en valores totales diarios durante la semana de muestreo*

Precipitación durante la semana del muestreo (en mm)			
Municipio	Primer muestreo	Segundo muestreo	Tercer muestreo
Girardota (vereda San Andrés)	53	23	41
Zaragoza	72	123	5
Frontino	90	33	29
Granada	161	132	66
Arboletes	2,1	67,4	Lloviznas leves
Puerto Berrío	171	Fuertes precipitaciones	Lloviznas leves
Venecia	Lluvias moderadas	Fuertes precipitaciones	Lloviznas leves
San Pedro de los Milagros	Lluvias moderadas	Fuertes precipitaciones	Lloviznas leves
Cisneros	Lluvias moderadas	Fuertes precipitaciones	Lloviznas leves

*Los datos suministrados por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) se muestran en valores cuantitativos y los datos suministrados por los funcionarios de los acueductos, mediante descripciones cualitativas.

Universidad de Antioquia, donde se almacenaron a 4 °C durante 24 horas como máximo, antes de proceder con el protocolo de concentración.

Concentración de partículas virales

Las muestras de agua de suministro de los acueductos se concentraron empleando la metodología de filtración y ultrafiltración tangencial descrita previamente por Peláez, *et al.* (33), con filtros de 0,8, 0,45 y 0,22 µm. Las muestras de agua residual del primer muestreo se concentraron mediante la técnica de polietilenglicol descrita por Sobsey (34) con las modificaciones introducidas en el protocolo por González, *et al.* (35). Para el segundo y el tercer muestreos, se utilizaron las técnicas de polietilenglicol descritas por Martínez, *et al.* (36), y la de floculación con leche descremada descrita por Calgua, *et al.* (37,38). Los productos de la concentración viral se almacenaron a -70 °C hasta su posterior análisis.

Extracción de ARN y reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

La extracción de ARN viral se hizo en 140 µl del producto de la concentración viral utilizando un estuche comercial (QIAamp viral RNA mini kit®, Qiagen, Alemania). Se hizo una primera reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcripción inversa para amplificar un fragmento de 192 pb de la región VP3-VP1 del genoma viral según la descripción de Schwab, *et al.* (39). Este es el protocolo de referencia del Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud para el diagnóstico y para muestras ambientales.

La reacción con transcripción inversa se hizo con un volumen final de 20 µl. Se utilizaron los iniciadores Random Primers 1,5 mM™ (Invitrogen, Life Technologies, USA) y Super Script III 200 U/µl™ (Invitrogen™, Life Technologies, USA), y 10 µl del ARN. La síntesis de ADN complementario se hizo a 55 °C durante 60 minutos y la reacción se inactivó a 70 °C durante 15 minutos.

Posteriormente, la amplificación se hizo con los oligonucleótidos HAV-L (nucleótidos 2019-2038, 5'-CAGCACATCAGAAAGGTGAG-3') y HAV-R (nucleótidos 2192-2210, 5'-CTCCAGAATCATCTC CAAC-3') (39) y 5 µl de ADN complementario. El protocolo consistió en la desnaturalización inicial a 95 °C durante tres minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos; hibridación a 52 °C durante 35 segundos; una extensión a 72 °C durante 35 segundos, y una extensión final a 72 °C durante siete minutos.

Las muestras positivas para la detección del genoma del VHA se sometieron a una segunda PCR con transcripción inversa anidada, según lo descrito por Mitsui, *et al.* (40), la cual amplifica un fragmento de 522 pb de la región VP1-2A para la identificación del genotipo. La síntesis de ADN complementario se hizo utilizando el oligonucleótido HA022 (nucleótidos 3414-3435, 5'-TTTTCATCY TTCATTTCTGTCC-3') en las mismas condiciones descritas previamente para la PCR con transcripción inversa empleada en la detección.

La primera ronda de amplificación se hizo con los oligonucleótidos HA022 y HA021 (nucleótidos 2888-2912, 5'-ATTGCAAATTAYAAAYCAYTCTGATG-3') y 10 µl de ADN complementario. El protocolo consistió en la desnaturalización inicial a 94 °C durante dos minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 52 °C durante 30 segundos; una extensión a 72 °C durante 60 segundos, y una extensión final a 72 °C durante siete minutos.

Se procedió de manera similar en la segunda ronda de amplificación con los oligonucleótidos HA023 (nucleótidos 2903-2922, 5'-CATTCTGATGAATA YTTGTC-3') y HA024 (nucleótidos 3404-3424, 5'-CATTCTGTCCATTTTTCATC-3'). El protocolo de amplificación fue de 25 ciclos en las mismas condiciones de la primera ronda.

Se emplearon 5 U/µl de la enzima GoTaq Flexi DNA Polymerase® (GoTaq, Promega Corporation, USA) para todos los ensayos de amplificación. Los ensayos de PCR con transcripción inversa se hicieron por duplicado con el ARN obtenido de cada muestra en una dilución de 1:10, para controlar la posible presencia de inhibidores de la PCR en las muestras analizadas.

Los productos de la PCR se visualizaron en gel de agarosa al 2 % en solución tampón TAE 1X, teñido con bromuro de etidio (0,1mg/ml). Como control positivo se utilizó una muestra de suero de un paciente con resultado positivo para la infección por HAV, la cual fue donada por el Instituto Nacional de Salud.

Análisis filogenético

Se secuenció el producto de amplificación de la región VP1-2A (522 pb) (MacroGen Inc., Corea). En la base de datos de la filogenia de HAV, se incluyeron únicamente secuencias del genoma completo del VHA, con caracterización del genotipo y el subgenotipo. Se depuraron las secuencias similares entre sí mediante el uso de un análisis de

distancias (*Pairwise Distance Test*). El alineamiento y la edición de las secuencias resultantes se hicieron en el programa BioEdit 7.1.11, y la filogenia se elaboró en el programa MEGA 5.2 con el método de máxima verosimilitud y el modelo evolutivo Tamura de tres parámetros más sitios invariantes (T92+I), escogido con base en el mejor criterio de información bayesiano (BIC). Se utilizaron 1.000 réplicas de *bootstrap*.

Resultados

Durante el primer muestreo, el genoma del HAV se detectó en las muestras de agua residual recolectadas en los municipios de Venecia, Arboletes y Zaragoza (30 %, 3/10), así como en las muestras de agua de la fuente principal de suministro de los acueductos del corregimiento de Nutibara y el municipio de Puerto Berrío (20 %, 2/10). En el segundo muestreo, el genoma del HAV se detectó únicamente en la muestra de agua residual recolectada en la cabecera municipal del municipio de Frontino (10 %, 1/10). Todas las muestras obtenidas durante el tercer muestreo fueron negativas para la detección del genoma viral. En total, el genoma del HAV se detectó en 13,3 % (4/30) de las muestras de agua residual y en 6,6 % (2/30) de las muestras del agua de suministro de los acueductos (cuadro 3), es decir, 10 % (6/60) del total de muestras obtenidas durante el periodo de estudio.

Mediante la PCR con transcripción inversa anidada fue posible amplificar la región VP1-2A con fines de genotipificación en cuatro de las seis muestras positivas. La base de datos para la construcción de la filogenia del HAV se conformó con las secuencias del genoma completo de los subgenotipos IA, IB, IIA, IIB, IIIA y IIIB disponibles

en GenBank. Además, se incluyó una secuencia del genotipo V como raíz del árbol filogenético. El subgenotipo IA del HAV se asignó a las muestras de estudio con un soporte de rama de 97 % según el árbol filogenético resultante (figura 2). Las secuencias de estudio se concentraron en dos grupos diferentes, uno de ellos conformado por secuencias de Uruguay, Alemania y Argentina, y el otro conformado por secuencias de Japón, China y México (figura 2).

Discusión

Se sabe que la contaminación del agua para consumo es uno de los principales vehículos de transmisión de microorganismos patógenos al humano. La vigilancia de la calidad del agua para consumo humano y el apoyo durante los brotes de hepatitis A son dos estrategias importantes en la prevención de la transmisión de virus entéricos, como es el caso del virus de la hepatitis A.

En Colombia, las características de calidad del agua potable se encuentran reglamentadas desde el 2007 (41,42). En dicha reglamentación se utilizan como indicadores de contaminación microbiana las pruebas de coliformes totales y *Escherichia coli* y, además, se requiere del análisis de los parásitos *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. La evaluación de los virus no está reglamentada, pero según el artículo 12 de la Resolución 2115 (42), con base en el mapa de riesgos se debe verificar la presencia de otros microorganismos patógenos en el agua, así como la viabilidad de establecer otros indicadores. Por lo tanto, en los municipios donde se presenta el riesgo de contaminación por HAV, se debe evaluar la posibilidad de integrar su detección como indicador de la calidad del agua potable.

Cuadro 3. Detección del genoma del VHA en muestras de agua residual y agua de abastecimiento durante el periodo de estudio

Municipio	Primer muestreo Diciembre de 2012 a mayo de 2013		Segundo muestreo Septiembre a noviembre de 2013		Tercer muestreo Diciembre de 2013 a abril de 2014	
	Residual	Abastecimiento	Residual	Abastecimiento	Residual	Abastecimiento
Girardota (vereda San Andrés)	-	-	-	-	-	-
San Pedro de los Milagros	-	-	-	-	-	-
Venecia	+	-	-	-	-	-
Granada	-	-	-	-	-	-
Cisneros	-	-	-	-	-	-
Arboletes	+	-	-	-	-	-
Zaragoza	+	-	-	-	-	-
Frontino	-	-	+	-	-	-
Corregimiento Nutibara	-	+	-	-	-	-
Puerto Berrío	-	+	-	-	-	-

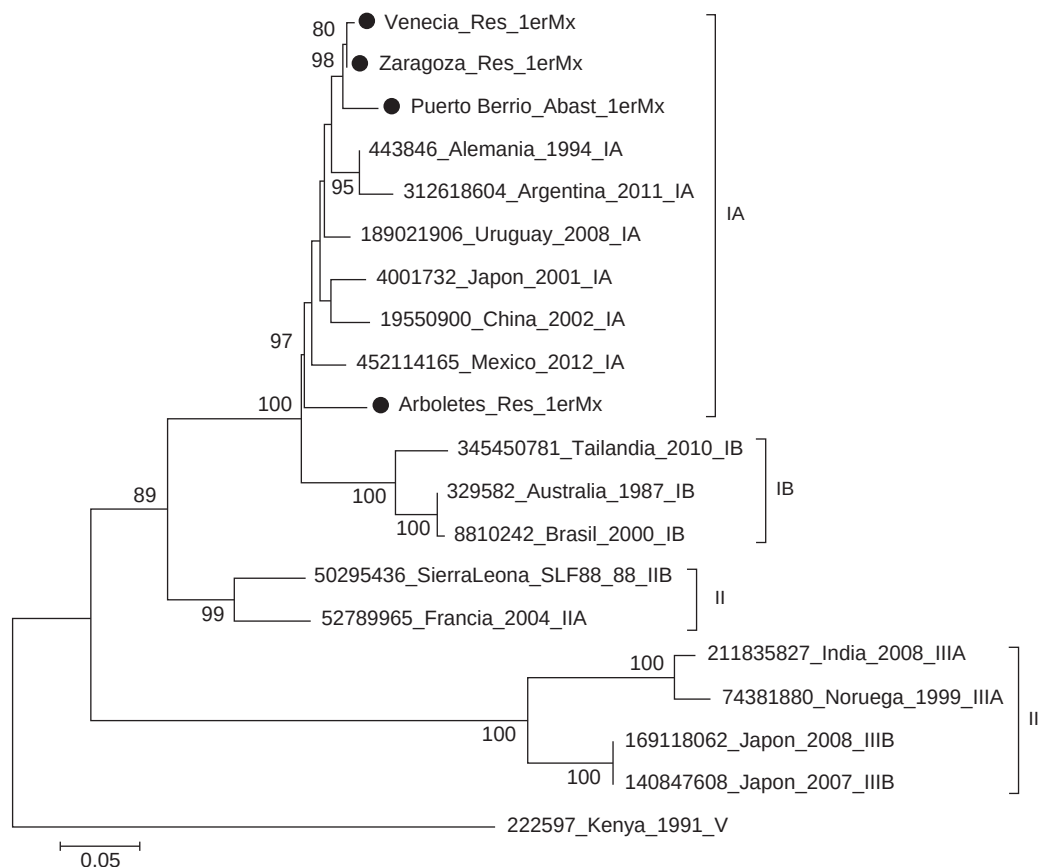


Figura 2. Filogenia del virus de la hepatitis A elaborada a partir de la amplificación de un fragmento de 522 pb de la región VP1-2A. El árbol filogenético se obtuvo con el programa Mega 5.2 empleando el método de máxima verosimilitud en el marco del modelo de Tamura de tres parámetros más sitios invariantes (T92+I), seleccionado con base en el criterio de información bayesiano. Las secuencias de estudio se indican con un círculo negro y el clado del subgenotipo IA se identifica en color gris. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores de 70 % después de 1.000 réplicas. Las secuencias se identifican con el número de acceso a GenBank, seguido del país, el año de aislamiento y el genotipo. Las denominadas Venecia_Res_1erMx, Zaragoza_Res_1erMx y Arboletes_Res_1erMx, corresponden a las muestras de agua residual recolectadas durante el primer muestreo en los municipios de Venecia, Zaragoza y Arboletes. La denominada Puerto Berrío_Abast_1erMx corresponde a la muestra de agua de suministro del acueducto del municipio en mención, recolectada durante el primer muestreo.

La Resolución 2115 de 2007 (42) establece el índice de calidad del agua para consumo humano como un instrumento básico para garantizar la calidad del agua potable. Este índice se calcula a partir de la determinación de 20 parámetros físicoquímicos (con un cumplimiento mínimo de 60 puntos sobre 100) y dos parámetros microbiológicos (cumplimiento mínimo de 40 puntos sobre 100).

En el 2013 este índice fue de 26,57 en el país, un valor que se considera indicativo de riesgo medio; al discriminar por zona urbana (cabeceras de los municipios), el índice fue de 11,28, lo que corresponde a riesgo bajo, mientras que la zona rural presentó un índice de 52,12, el cual se considera de alto riesgo. Estos datos indican un avance en cuanto a la calidad del agua en las

cabeceras municipales (zona urbana), según lo registrado entre 2007 y 2013; sin embargo, el mismo índice en las poblaciones rurales se ha mantenido en valores indicativos de riesgo alto. En este sentido, las muestras de agua para consumo humano obtenidas en el 2013 en la zona rural demostraron que solo 18 % de la población rural tenía acceso al agua potable, 15,1 % a agua tratada con riesgo bajo o medio (agua segura), y 66,9 % de la población consumía agua no tratada obtenida a través de un sistema de acueducto (43,6 %) o adquirida directamente de la quebrada o el río (23,3 %) (43).

La situación del departamento de Antioquia difiere un tanto de lo observado en las cifras consolidadas del país. Este departamento cuenta con 125 municipios y una población de 6'299.990

habitantes, 77,8 % en la zona urbana y 22,2 % en la zona rural. En 2013 este indicador fue de 9,41 para el departamento: 8,94 en la zona rural y 9,4 en la zona urbana (44). Sin embargo, vale la pena anotar que 82,1 % de la población del departamento tiene acceso al agua potable, 4,83 % a agua tratada (con riesgo mínimo y medio), y 2,96 % a agua no tratada.

El análisis por municipio demostró que en el 2013, Cisneros tenía un índice de calidad del agua para consumo humano de 86,17, mientras que en Zaragoza y Puerto Berrío se registraron valores de riesgo medio: 30,75 y 14,15, respectivamente (43).

Los resultados del presente estudio complementan la información de la vigilancia de la calidad del agua, y demostraron la circulación del HAV en 6,6 % (2/30) de las muestras de agua de la fuente de suministro de los acueductos recolectadas en la quebrada La Golondrina, corregimiento de Nutibara, y en el río Magdalena, municipio de Puerto Berrío, así como en 13,3 % (4/30) de las muestras de agua residual de los municipios de Arboletes, Venecia, Frontino y Zaragoza. Vale la pena resaltar que Puerto Berrío cuenta con planta de potabilización, mientras que el corregimiento de Nutibara no tiene ningún tipo de infraestructura para la potabilización de agua de suministro del acueducto local, lo que pone en evidencia el riesgo de infección por HAV para la comunidad.

Los procesos y operaciones unitarias de potabilización del agua deben garantizar una eficiencia de cuatro logaritmos (99,99 %) en la remoción de patógenos y virus (44), eficiencia que normalmente se logra utilizando los procesos convencionales de coagulación, floculación, sedimentación, filtración y desinfección (44). En la desinfección, generalmente se utilizan la cloración, la ozonización o la radiación ultravioleta, las cuales son confiables para la eliminación de virus y patógenos en cuatro logaritmos (44-46). Sin embargo, se deben resaltar dos hechos importantes: primero, es necesario contar con un proceso de desinfección residual para prevenir nuevas contaminaciones en la red de distribución, y solo la cloración cumple con esta condición; por lo tanto, cuando se utilizan las técnicas de ozonización o radiación ultravioleta, debe haber un proceso posterior de cloración para garantizar la calidad del agua en la red de acueducto.

El segundo elemento para garantizar la calidad del agua potable son los procesos previos (coagulación, floculación, sedimentación, filtración), los cuales

garantizan eficiencias de dos logaritmos (99 %) (42); por lo tanto, el lograr 99,99 % de eficiencia en la remoción de virus y agentes patógenos depende del proceso de desinfección, y cualquier deficiencia en dicho proceso genera el riesgo de contaminación microbiológica y viral para la población. Por consiguiente, si existe evidencia o sospecha de la presencia del VHA en la fuente de abastecimiento (río o quebrada) de la planta de agua potable, se debe adelantar el proceso de desinfección con el mayor rigor posible.

En poblaciones donde no exista planta de tratamiento, es necesario tomar medidas preventivas como la cloración de emergencia, la desinfección por temperatura del agua para consumo humano y la educación de la población. Este es el caso del corregimiento de Nutibara, que no cuenta con planta de potabilización y donde se demostró la presencia del HAV durante el periodo de estudio en la quebrada que abastece el acueducto de este asentamiento (cuadro 2). Teniendo en cuenta estos hallazgos y la incidencia de la hepatitis A notificada en este corregimiento, se ofreció apoyo técnico para la cloración, y se llevaron a cabo actividades educativas con la comunidad haciendo énfasis en el control y la prevención de la enfermedad.

Durante el periodo de estudio, se notificaron 13 casos de hepatitis A en seis de los nueve municipios (cuadro 4). Durante las semanas del primer muestreo se notificaron casos en las poblaciones de estudio de Puerto Berrío, Girardota, Arboletes, Frontino, San Pedro de los Milagros y Zaragoza, y en los últimos cuatro mencionados se detectó el HAV en muestras ambientales. En el segundo muestreo, se notificaron dos casos en el municipio de Frontino de muestras de agua residual positivas para la detección del genoma viral. En el tercer muestreo se notificó un único caso de hepatitis A en el municipio de Zaragoza, aunque durante este lapso no se obtuvo ninguna muestra de agua positiva para la detección del genoma del HAV.

Si bien no fue posible establecer una relación entre los resultados obtenidos en las muestras de agua y los casos reportados en el Sivigila, los hallazgos coincidieron con estos en cuatro municipios, y unos y otros registraron una tendencia a la disminución.

La detección de partículas virales en las muestras ambientales depende en gran medida de la eficiencia de la técnica utilizada para establecer la concentración de partículas virales, como son la floculación con leche descremada, la ultrafiltración, la liofilización y la ultracentrifugación, entre otras

Cuadro 4. Casos de hepatitis A notificados durante el período de estudio

Municipio	Número de casos de hepatitis A reportados en el Sivigila		
	Semana 48 de 2012 a semana 22 de 2013 (1 ^{er} muestreo)	Semana 36 a semana 48 de 2013 (2 ^{do} muestreo)	Semana 49 de 2013 a semana 18 de 2014 (3 ^{er} muestreo)
Girardota (vereda San Andrés)	4	0	0
San Pedro de los Milagros	1	0	0
Venecia	0*	0	0
Granada	0	0	0
Cisneros	0	0	0
Arboletes	1*	0	0
Zaragoza	1*	0	1
Frontino	1	2*	0
Corregimiento Nutibara (Frontino)	0†	0	0
Puerto Berrío	2†	0	0
Total	10	2	1

Los valores en negrilla indican los casos en los que el resultado positivo de las muestras de estudio coincide con la notificación de casos de hepatitis A en el Sivigila.

* Muestras de agua residual positivas en la detección del genoma del VHA

† Muestras de la fuente principal de suministro del acueducto municipal positivas en la detección del genoma del VHA

(33-35,37-39,47). En el 2013, Calgua, *et al.* (38), publicaron un estudio en el que se registraron diferencias en el rendimiento de la técnica al medir el porcentaje de recuperación viral (38,47). La técnica de floculación con leche descremada demostró ser más eficiente y conveniente en cuanto a su costo-efectividad y el tiempo de procesamiento de la muestra (38). Dada la naturaleza del agua residual, no es recomendable concentrar las muestras mediante técnicas que utilicen filtros o membranas antes de su tratamiento, ya que los virus pueden perderse junto con la materia orgánica previamente filtrada, lo cual disminuye el porcentaje de recuperación.

En el presente estudio las muestras de la fuente de abastecimiento de los acueductos municipales se concentraron por filtración y ultrafiltración tangencial, una técnica ya estandarizada que se emplea en el Instituto Nacional de Salud para la vigilancia de la calidad de agua para consumo humano (16,29,33,38). Para las muestras de aguas residuales, se utilizaron dos metodologías (la de polietilenglicol y la floculación con leche), con el fin de incrementar la probabilidad de detectar el genoma del HAV.

Con base en los resultados obtenidos, no se observó ninguna diferencia entre estas técnicas, aunque cabe resaltar que, dado el número de muestras analizadas, las condiciones de pluviosidad y la ausencia de una prueba de referencia, no fue posible llevar a cabo los análisis estadísticos adecuados para hacer inferencias sobre la eficiencia de los protocolos utilizados. Aun así, se observaron

algunas ventajas de la técnica de floculación con leche descremada frente a la de polietilenglicol en cuanto al volumen de la muestra inicial, el tiempo total de procesamiento de la muestra y los costos de los reactivos, como lo habían descrito previamente Calgua, *et al.* (38).

Por otra parte, no se puede descartar que las técnicas utilizadas en el segundo y el tercer muestreo fueran menos eficientes que la de concentración de partículas virales del primer muestreo. Debe señalarse que la técnica de polietilenglicol fue empleada en los tres muestreos; sin embargo, el protocolo para el segundo y el tercer muestreo difirió del primero en el control del pH y en la relación de los gramos de sedimento y los volúmenes utilizados.

En cuanto a las condiciones de pluviosidad, las lluvias pueden tener dos efectos sobre las corrientes de agua. En el caso de las fuentes de abastecimiento de los acueductos, cuando ocurren cambios drásticos en la precipitación pluvial, es decir, en la transición de verano (época seca) a invierno, el agua lluvia tiene un efecto de “lavado” en la cuenca de la quebrada, lo que causa la remoción del material orgánico que es transportado al cauce principal y puede producir un aumento en las cargas de contaminación.

Por el contrario, una vez iniciada la época de lluvias, con la cuenca lavada por las primeras precipitaciones, se presenta un fenómeno de dilución de los contaminantes en los cuerpos de agua. En el caso de las aguas residuales, las

fuertes precipitaciones diluyen la materia orgánica presente en los efluentes cloacales. Este hecho se relaciona con el tipo de alcantarillado combinado de aguas residuales y aguas lluvias que se utiliza en el país. En época seca la materia orgánica y los contaminantes tienden a concentrarse en los sistemas de alcantarillado, ya que no ocurre la dilución por aguas lluvias.

Estos efectos se evidenciaron durante los muestreos: cuando había llovido antes de la fecha de la toma de muestras, las muestras de agua residual se notaban diluidas con respecto a las tomadas con anterioridad, lo cual se vio reflejado en la aplicación de los protocolos de concentración dado que las partículas virales se asocian con la materia orgánica presente en el agua; pero, como ya se mencionó, no fue posible determinar con precisión de qué manera estas variables afectaron la detección del genoma viral del HAV.

En el análisis filogenético se identificó el subgenotipo IA del HAV en las muestras recolectadas en Arboletes, Venecia, Zaragoza y Puerto Berrío. En el caso de las muestras recolectadas en el municipio de Frontino (corregimiento de Nutibara y cabecera municipal) no fue posible identificar las secuencias, probablemente por la baja concentración del ARN viral y la presencia de posibles inhibidores de la PCR con transcripción inversa en la muestra.

Según los resultados que se muestran en la figura 2, las secuencias de Venecia, Zaragoza y Puerto Berrío son evolutivamente más cercanas a los aislamientos identificados en Alemania y Argentina, mientras que la secuencia de la muestra recolectada en el municipio de Arboletes está más estrechamente relacionada con aislamientos de China, Japón y México. Esto podría sugerir la circulación de dos variantes del HAV en Colombia, pero, en la construcción de la base de datos de la filogenia no fue posible incluir más secuencias de estudios practicados en Latinoamérica, pues algunas de estas secuencias aún no han sido publicadas en GenBank o corresponden a la amplificación de otras regiones del genoma del VHA.

En Latinoamérica, se ha evidenciado previamente la circulación del HAV en muestras ambientales. En 2010, Betancourt, *et al.*, determinaron la presencia del HAV en una corriente altamente contaminada del área urbana de Caracas, Venezuela. Los resultados indicaron la circulación de cepas de HAV, subgenotipo IA, estrechamente relacionadas con cepas aisladas de muestras de pacientes

con diagnóstico de hepatitis A en la región (14). Prado, *et al.*, estudiaron en 2012 muestras de agua residual del área urbana de Río de Janeiro, Brasil, y encontraron 14 muestras (58 %) positivas para HAV, de las cuales cuatro correspondían al subgenotipo IA (12). Igualmente, en Argentina, en 2014, Yáñez, *et al.*, detectaron el genoma del HAV en 20,8 % (5/24) de las muestras de agua residual y en 16,1 % (5/31) de las muestras de río de la ciudad de Córdoba. El subgenotipo IA fue identificado en tres de las muestras positivas de agua residual (15). En Colombia, Sánchez, *et al.*, identificaron recientemente el subgenotipo IA del HAV en muestras de suero y agua remitidas al Instituto Nacional de Salud entre 2008 y 2012, procedentes de ocho departamentos del país. Las secuencias obtenidas a partir de las muestras de suero y agua recolectadas durante el brote de la hepatitis en el departamento de Putumayo presentaron 98 % de identidad en los nucleótidos con la cepa S79s reportada en Venezuela, lo cual sugiere su circulación en la región (16). Cabe resaltar que las secuencias del estudio en mención no se incluyeron en el análisis filogenético presentado en la figura 2 debido a que no están disponibles en GenBank.

En el presente estudio el genoma del HAV se detectó con menor frecuencia que en los estudios mencionados, lo cual puede deberse a varios factores: primero, las diferencias de los estudios en grandes urbes y aquellas localidades con menos población usuaria de las fuentes de agua. Es de esperar que exista una relación directamente proporcional entre el número de habitantes y la contaminación microbiológica de los respectivos efluentes cloacales. Segundo, estos resultados también se pueden relacionar con la variabilidad de la región genómica VP3-VP1 amplificada por la PCR con transcripción inversa utilizada en el presente estudio y en el de Sánchez, *et al.* (16). La estrategia de amplificación en los estudios con muestras ambientales consiste en una PCR con transcripción inversa o en una anidada de la región 5'NCR del genoma de HAV, con una variabilidad de nucleótidos entre genotipos de menos de 5 % comparada con 15 a 20 % de la región VP3-VP1. La estrategia de amplificación utilizada en el presente estudio permitió la identificación de las cepas presentes en las muestras ambientales, sin embargo, la sensibilidad de la técnica puede haber repercutido en el número de muestras positivas. Cabe anotar que la estrategia de amplificación utilizada en este estudio está validada tanto para

el diagnóstico como para el análisis de muestras ambientales por el laboratorio de referencia en virología del Instituto Nacional de Salud.

Los resultados obtenidos en este estudio son de interés para las autoridades sanitarias y ambientales a nivel local, pues permiten complementar la información disponible para aportar al diseño de las políticas en salud pública relacionadas con la calidad del agua para consumo humano, así como con el manejo de desechos y la educación ambiental en las comunidades orientada a proteger y conservar los recursos naturales.

Además, la metodología utilizada puede aplicarse en los laboratorios de salud pública del país y contribuir, así, a la generación de nueva información sobre la circulación de los genotipos del HAV en muestras ambientales, lo cual es de gran utilidad para la comunidad científica nacional e internacional. Deben hacerse estudios adicionales para caracterizar las cepas que circulan en Antioquia y en otras áreas del país, y establecer su relación con las de países de la región.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiación

Este proyecto fue financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias (111554531673) y la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Antioquia (Proyecto de sostenibilidad).

Agradecimientos

A las autoridades sanitarias, al personal de los acueductos y a las juntas de acción comunal de cada municipio, por su colaboración en la realización de este estudio.

Referencias

1. **Knipe D, Howley P.** Fields Virology. Sixth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 551-81.
2. **Provost PJ, Hilleman MR.** Propagation of human hepatitis A virus in cell culture *in vitro*. Exp Biol Med. 1979;160:213-21. <http://dx.doi.org/10.3181/00379727-160-40422>
3. **Feng Z, Hensley L, McKnight KL, Hu F, Madden V, Ping L, et al.** A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. Nature. 2013;496:367-71. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12029>
4. **Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, et al.** Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. J Gen Virol. 1992;73:1365-77. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-73-6-1365>
5. **Cristina J, Costa-Mattioli M.** Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus. Virus Res. 2007;127:151-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2007.01.005>
6. **Aguirre S, Malirat V, Scodeller E, Mattion N.** First full-length genomic sequence of a hepatitis A virus isolated in Argentina shows recombination between subgenotypes IA and IB. Virus Res. 2011;155:316-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2010.10.030>
7. **Joshi MS, Walimbe AM, Chitambar SD.** Evaluation of genomic regions of hepatitis A virus for phylogenetic analysis: Suitability of the 2C region for genotyping. J Virol Methods. 2008;153:36-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.06.014>
8. **Báez-Triana PA, Navas-Navas MC.** Infección por el virus de la hepatitis A: epidemiología y diversidad génica. Iatreia. 2015;28:157-69. <http://dx.doi.org/10.17533/udea.iatreia.v28n2a06>
9. **Nainan OV, Xia G, Vaughan G, Margolis HS.** Diagnosis of hepatitis A virus infection: A molecular approach. Clin Microbiol Rev. 2006;19:63-79. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.19.1.63-79.2006>
10. **Theamboonlers A, Abe K, Thongmee C, Poovorawan Y.** Complete coding sequence and molecular analysis of hepatitis A virus from a chimpanzee with fulminant hepatitis. J Med Primatol. 2012;41:11-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0684.2011.00515.x>
11. **Deinhardt F, Holmes AW, Capps RB, Popper H.** Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. J Exp Med. 1967;125:673-88. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.125.4.673>
12. **Sulbarán Y, Gutiérrez CR, Márquez B, Rojas D, Sánchez D, Navas J, et al.** Hepatitis A virus genetic diversity in Venezuela: Exclusive circulation of subgenotype IA and evidence of quasispecies distribution in the isolates. J Med Virol. 2010;82:1829-34. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21856>
13. **Prado T, Fumian TM, Miagostovich MP, Gaspar AM.** Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012;106:104-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.005>
14. **Betancourt WQ, Querales L, Sulbarán YF, Rodríguez-Díaz J, Caraballo L, Pujol FH.** Molecular characterization of sewage-borne pathogens and detection of sewage markers in an urban stream in Caracas, Venezuela. Appl Environ Microbiol. 2010;76:2023-6. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02752-09>
15. **Yáñez LA, Lucero NS, Barril PA, Díaz M de P, Tenaglia MM, Spinsanti LI, et al.** Evidence of hepatitis A virus circulation in central Argentina: Seroprevalence and environmental surveillance. J Clin Virol. 2014;59:38-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.11.005>
16. **Sánchez J, Villamil L-T, Rodríguez J, Rincón M, Méndez J, Sánchez C, et al.** Genotipos del virus de hepatitis A circulantes en Colombia, 2008-2012. Hechos Microbiológicos. 2013;4:94.
17. **Cuthbert JA.** Hepatitis A: Old and new. Clin Microbiol Rev. 2001;14:38-58. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.14.1.38-58.2001>

18. **Organización Mundial de la Salud.** Hepatitis A. Nota descriptiva N.º328. Fecha de consulta: 1 de junio de 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs328/es/>
19. **Franco E, Meleleo C, Serino L, Sorbara D, Zaratti L.** Hepatitis A: Epidemiology and prevention in developing countries. *World J Hepatol.* 2012;4:68-73. <http://dx.doi.org/10.4254/wjh.v4.i3.68>
20. **Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, et al.** World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *PLoS Med.* 2015;12:e1001923. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1001923>
21. **Jacobsen KH, Wiersma ST.** Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine.* 2010;28:6653-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.037>
22. **Vacchino MN.** Incidence of hepatitis A in Argentina after vaccination. *J Viral Hepat.* 2008;15:47-50. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2893.2008.01029.x>
23. **Vizzotti C, González J, Gentile A, Rearte A, Ramonet M, Cañero-Velasco MC, et al.** Impact of the single-dose immunization strategy against hepatitis A in Argentina. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33:84-8. <http://dx.doi.org/10.1097/inf.0000000000000042>
24. **Ximenes RA, Martelli CM, Amaku M, Sartori AM, de Soárez PC, Novaes HM, et al.** Modelling the force of infection for hepatitis A in an urban population-based survey: A comparison of transmission patterns in Brazilian macro-regions. *PLoS ONE.* 2014;9:e94622. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094622>
25. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Lineamiento estratégico para la introducción de la vacuna contra la hepatitis A en el esquema del Programa Ampliado de Inmunizaciones – PAI. Colombia 2013. Fecha de consulta: 13 de julio de 2015. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Lineamientos%20estrat%C3%A9gicos%20para%20la%20Introducci%C3%B3n%20de%20la%20vacuna%20contra%20la%20Hepatitis%20A.pdf>
26. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del evento hepatitis A hasta el periodo epidemiológico XIII, Colombia, 2014. Fecha de consulta: 15 de junio de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/Hepatitis%20A%202014.pdf>
27. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del evento hepatitis A hasta el periodo epidemiológico XII, Colombia, 2015. Fecha de consulta: 10 de febrero de 2016. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/HEPATITIS%20A%20Periodo%20XII%202015.pdf>
28. **Instituto Nacional de Salud.** Vigilancia rutinaria por evento departamental 2014. Fecha de consulta: 10 de febrero de 2016. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Paginas/vigilancia-rutinaria.aspx>
29. **Peláez-Carvajal D, Rodríguez J-A, Rocha-Hernández L, Ardila-Buitrago M, Méndez JA, Sánchez CM.** Detección de virus entéricos en agua para consumo humano asociados a brotes de enfermedad diarreica aguda y hepatitis A en Colombia, 2008-2013. *Hechos Microbiológicos.* 2013;4:80.
30. **Dirección Seccional de Salud de Antioquia.** Casos e incidencia de hepatitis A por subregión y municipio de Antioquia 2000-2012. Otras enfermedades en la región 2000 a 2012. Fecha de consulta: 20 de marzo de 2015. Disponible en: <http://www.dssa.gov.co/index.php/estadisticas/eventos-en-salud-publica?start=4>
31. **Secretaría de Salud y Protección Social de Frontino.** Casos presentados de hepatitis A en el municipio de Frontino durante los años 2011, 2012 y 2013. Frontino, Antioquia: Secretaría de Salud y Protección Social; 2014.
32. **Secretaría Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia.** Población total según zona por subregiones y municipios. Antioquia 2009. Fecha de consulta: 2 de julio de 2015. Disponible en: <https://www.dssa.gov.co/index.php/estadisticas/poblacion/item/66-poblacion-2009>
33. **Peláez D, Rodríguez JA, Rocha EL, Rey GJ.** Estandarización de un método de concentración y detección de virus entéricos en aguas de consumo. *Biomédica.* 2010;30:276-86. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v30i2.191>
34. **Sobsey MD, Oglesbee SE, Wait DA.** Evaluation of methods for concentrating hepatitis A virus from drinking water. *Appl Environ Microbiol.* 1985;50:1457-63.
35. **González MM, Sarmiento L, Castaño JC, Giraldo AM.** Detección de poliovirus en aguas residuales de Armenia, Colombia. *Rev Salud Pública (Bogotá).* 2006;8(Supl.1):13-26. <http://dx.doi.org/10.1590/S0124-00642006000400002>
36. **Martínez-Wassaf MG, Pisano MB, Barril PA, Elbarcha OC, Pinto MA, Mendes de Oliveira J, et al.** First detection of hepatitis E virus in Central Argentina: Environmental and serological survey. *J Clin Virol.* 2014;61:334-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.016>
37. **Calgua B, Mengewein A, Grunert A, Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Hundesa A, et al.** Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J Virol Methods.* 2008;153:79-83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.003>
38. **Calgua B, Rodríguez-Manzano J, Hundesa A, Suñen E, Calvo M, Bofill-Mas S, et al.** New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J Virol Methods.* 2013;187:215-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.10.012>
39. **Schwab KJ, De León R, Sobsey MD.** Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:531-7.
40. **Mitsui T, Tsukamoto Y, Hirose A, Suzuki S, Yamazaki C, Masuko K, et al.** Distinct changing profiles of hepatitis A and E virus infection among patients with acute hepatitis, patients on maintenance hemodialysis and healthy individuals in Japan. *J Med Virol.* 2006;78:1015-24. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.20657>
41. **Ministerio de la Protección Social.** Decreto 1575 de 2007. Fecha de consulta: 10 de febrero de 2016. Disponible en: https://www.minambiente.gov.co/images/normativa/decretos/2007/dec_1775_2007.pdf

42. **Ministerio de Protección Social, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.** Resolución 2115 de 2007. Fecha de consulta: 10 de febrero de 2016. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/programas-de-calidad/Documents/resolucion%202115%20de%202007,MPS-MAVDT.pdf>
43. **Instituto Nacional de Salud.** Estado de la vigilancia de la calidad del agua para consumo humano en Colombia-2013. Fecha de consulta: 12 de junio de 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/sivicap/Normatividad/2014%20Estado%20de%20la%20vigilancia%20de%20la%20calidad%20del%20agua%202013.pdf?Mobile=1&Source=%2Fsivicap%2F_layouts%2Fmobile%2Fview.aspx%3FList%3Ddc462e4b-5de8-4a2f-be3a-08ad1c837db7%26View%3D0ac5f5c5-4988-442d-bc0e-2c07af4f66a5%26CurrentPage%3D1
44. **Albinana-Giménez N, Clemente-Casares P, Bofill-Mas S, Hundesa A, Ribas F, Girones R.** Distribution of human polyoma viruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environ Sci Technol.* 2006;40:7416-22. <http://dx.doi.org/10.1021/es060343i>
45. **Girones R, Carratalà A, Calgua B, Calvo M, Rodríguez-Manzano J, Emerson S.** Chlorine inactivation of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water. *J Water Health.* 2014;12:436-42. <http://dx.doi.org/10.2166/wh.2014.027>
46. **Widenmann A, Fischer B, Straub U, Wang C, Flehmig B, Schoenen D.** Disinfection of hepatitis A virus and MS-2 coliphage in water by ultraviolet irradiation: Comparison of UV-susceptibility. *Water Science and Technology.* 1993;27:335-8.
47. **Villar LM, de Paula VS, Diniz-Mendes L, Lampe E, Gaspar AMC.** Evaluation of methods used to concentrate and detect hepatitis A virus in water samples. *J Virol Methods.* 2006;137:169-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.06.008>
48. **Chigor V, Okoh A.** Quantitative RT-PCR detection of hepatitis A virus, rotaviruses and enteroviruses in the Buffalo River and source water dams in the Eastern Cape Province of South Africa. *Int J Environ Res Public Health.* 2012;9:4017-32. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph9114017>

ARTÍCULO ORIGINAL

Reguladores de integridad endotelial como posibles predictores de la gravedad en casos de dengue

Claudia Lucía Figueroa¹, Margarita Gélvez², Jürg Niederbacher³

¹ Grupo GERMINA, Departamento de Medicina Interna, Escuela de Medicina, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

² Centro de Investigaciones Epidemiológicas, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

³ Departamento de Pediatría, Escuela de Medicina, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Introducción. El dengue es una de las enfermedades transmitidas por mosquitos de mayor impacto en el mundo. La evolución clínica de la enfermedad suele ser impredecible, por lo cual su adecuado manejo en las fases tempranas podría incidir en la mejoría del paciente.

Objetivo. Evaluar los niveles séricos de algunos reguladores endoteliales (VEGF, sICAM-1, endoglina soluble, Ang-1 y Ang-2) como marcadores de predicción de la gravedad del dengue.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio de casos y controles anidado en una cohorte. En la fase temprana, los niveles de los reguladores endoteliales se midieron con ELISA. La relación entre las variables clínicas y los reguladores se analizó mediante regresión logística utilizando como variable de salida la gravedad del dengue. Con base en la relación entre las variables de interés y el resultado, se estableció un posible modelo predictor de la gravedad empleando la mejor área bajo la curva (ROC).

Resultados. La mediana de la edad fue de 24 años. Los casos graves se asociaron con niveles séricos de Ang-2 a partir de un punto de corte mayor o igual a 1.490 pg/ml, (*Odds ratio*, OR=3,1 p=0,015). Los niveles séricos de Ang-2, así como un área de 0,73 bajo la curva ROC, contribuyeron al modelo de predicción de la gravedad, conjuntamente con las variables de exantema, trastorno de conciencia y dolor abdominal, con OR de 3,2 (IC_{95%} 1,16-8,9; p=0,024).

Conclusión. El regulador endotelial Ang-2 podría ser un predictor de la gravedad en el dengue.

Palabras clave: endotelio, dengue, dengue grave, riesgo, permeabilidad capilar, predicción.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2878>

Regulators of endothelial integrity as severity predictors in dengue

Introduction: Dengue is currently among the mosquito-borne diseases of greatest global impact. The clinical course of the disease can be unpredictable, so proper handling in its early stages is critical to ensure optimal outcomes.

Objective: To evaluate serum regulators of endothelial integrity (VEGF, sICAM-1, sEndoglina, Ang-1, and Ang-2) as predictive markers of dengue severity.

Materials and methods: We conducted a case-control study nested in an appropriate cohort. Endothelial regulator levels were first measured by ELISA, after which analysis was performed using logistic regression of clinical and regulatory variables, with severity as an output variable. A possible severity prediction model, based on the variables of interest and output, was defined using the best area under the ROC curve.

Results: The median subject age was 24 years. Severe cases were associated with Ang-2 serum levels of $\geq 1,490$ ng/ml (OR=3.1; p=0.015). Serum levels of Ang-2 ($\geq 1,490$ ng/ml) contributed to the severity prediction model, as did a 0.73 area under the ROC curve, together with the variables rash, impaired consciousness and abdominal pain, with an OR of 3.2 (CI 95%: 1.16 to 8.9; p=0.024).

Conclusion: The endothelial regulator Ang-2 could be a predictor of severity in dengue.

Key words: Endothelium, dengue, severe dengue, risk, capillary permeability, forecasting.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2878>

Contribución de los autores:

Jürg Niederbacher y Margarita Gélvez: recolección de datos

Margarita Gélvez: análisis de las pruebas de laboratorio

Claudia Lucía Figueroa: análisis estadístico

Todos los autores participaron en el diseño de la propuesta y en la escritura del manuscrito.

El dengue es actualmente una de las enfermedades transmitidas por mosquitos de mayor interés en salud pública, debido a su incidencia y a la expansión del arbovirus hacia nuevas regiones del trópico y de las áreas subtropicales, por lo que hoy más de 40 % de la población mundial está en riesgo de contraer la enfermedad (1). La prevención y el control del dengue dependen exclusivamente de las medidas eficaces de lucha antivectorial (1). En Colombia, 75 % del territorio nacional está situado por debajo de los 1.800 metros y tiene condiciones de temperatura, humedad relativa y pluviosidad adecuadas para el vector y, además, se registra transmisión endémica urbana del dengue (2). En el 2013, los casos aumentaron más de 100 % con relación al año anterior (de 43.000 casos a más de 100.000 casos), así como la mortalidad en los casos graves de la enfermedad (4,7 %) (3).

Dado que no existe un tratamiento antiviral específico, el suministro oportuno de grandes volúmenes de líquidos endovenosos es la única intervención que reduce la gravedad y evita los casos fatales. No obstante, la selección clínica de aquellos pacientes a quienes se les debe ofrecer este tratamiento es difícil, puesto que en los primeros días de la enfermedad aquellos que evolucionan hacia la gravedad presentan los mismos síntomas de quienes no lo hacen.

Debido a que el choque por dengue produce una disminución acentuada de la resistencia vascular, probablemente relacionada con la pérdida de la integridad capilar y la consecuente extravasación de líquidos, se asume que las formas graves del dengue deben obedecer a un proceso de disfunción endotelial (4,5). Este mismo efecto se produce en otros procesos como la inflamación grave o la malaria cerebral, en cuyo desarrollo se observa que la disfunción endotelial desempeña un papel importante (6).

En los casos graves de dengue se ha observado el comportamiento de varios reguladores endoteliales (7), entre los cuales se cuentan la angiopoyetina-1 (Ang-1) y la angiopoyetina-2 (Ang-2), que parecen ser la llave de la regulación de la integridad vascular (8). En pacientes con fiebre hemorrágica y

choque por dengue se ha reportado la disminución de los niveles séricos de Ang-1 y el incremento en los niveles séricos de Ang-2 en la fase aguda en comparación con la fase de convalecencia y con individuos sanos de control. Al parecer, este desequilibrio contribuye a la fuga plasmática que se da en los casos de fiebre hemorrágica y choque por dengue (9,10).

Otro protagonista en la regulación endotelial es el factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), el cual promueve el crecimiento, la proliferación y la migración de células endoteliales. El VEGF aumenta en pacientes con dengue grave (11). Asimismo, la acción conjunta del VEGF y la Ang-2 se ha asociado significativamente con la fuga plasmática (12).

Otro marcador importante de la angiogénesis es la endoglina, la cual se expresa de forma acentuada en las células endoteliales, en especial, en el tejido inflamado. La forma soluble de la endoglina es liberada en la membrana celular y entra en circulación, probablemente por ruptura, mediante las metaloproteinasas de la matriz, causando disfunción endotelial. En un estudio sobre el uso de la endoglina soluble como predictor de la malaria, se encontró que los niveles superiores a 12 pg/ml se presentaban con mayor frecuencia en la malaria grave (46,5 %) y en la malaria complicada (85,7 %) que en otras condiciones causantes de fiebre (0 %), así como en los individuos sanos de control (0 %) (6).

Las moléculas de adhesión intercelular (*Intercellular Adhesion Molecule*, ICAM-1) se expresan en muchos tipos de células, incluidos los leucocitos y las células endoteliales, y su forma soluble (sICAM-1) es la que se detecta en suero, por lo cual el hallazgo de niveles altos de esta forma soluble se ha asociado a la presencia de enfermedades cardiovasculares, alteraciones autoinmunitarias y cáncer. En muchos estudios se han correlacionado los niveles de sICAM-1 con la gravedad de estas enfermedades (13). En 2006, Khongphatthanayothin, *et al.*, determinaron los niveles de sICAM-1 en pacientes con infección por el virus del dengue y encontraron que, en la etapa aguda de la enfermedad, dichos niveles eran significativamente más altos que en el seguimiento ($p=0,001$); sin embargo, al compararlos con los del grupo sano, no se diferenciaron ($p=0,12$) (14). En un estudio reciente se evaluaron varios reguladores endoteliales y se encontró que los

Correspondencia:

Claudia Lucía Figueroa, Carrera 32 N° 29-31, Bucaramanga, Colombia

Teléfono: (577) 634 4000, extensión 3105

clalufi@uis.edu.co

Recibido: 06/06/15; aceptado: 22/03/16

niveles séricos de sICAM-1 y de la endoglina soluble fueron más elevados en los pacientes que posteriormente desarrollaron fiebre hemorrágica y choque por dengue, comparados con los pacientes con síndrome febril causado por *Leptospira* spp., lo cual sugiere que la activación endotelial podría ser una vía importante del desarrollo del dengue (7).

Otro aspecto importante de este estudio fue la evaluación de otros biomarcadores como posibles reguladores de la predicción temprana de la gravedad en casos de infección por el virus del dengue, entre ellos, los siguientes: Tie-1, Tie-2, Ang-like 3, Ang-like 4, PCR, IP10, IL-18, VEGF, PCR, Ang-1, Ang-2, IL-10, sVEGR-2/KDR, sFlt-1, factor D, C5a y CHI 3L1.

El comportamiento de estos biomarcadores ha avivado el interés por encontrar otros predictores de la gravedad (7,15), contexto en el cual se inscribieron los objetivos de la presente investigación de caracterizar y precisar el comportamiento temprano de las moléculas VEGF, sICAM-1, endoglina soluble, Ang-1 y Ang-2 en nuestra población, además de establecer en qué medida dichos reguladores contribuyen en la predicción clínica de la gravedad de la enfermedad.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio de casos y controles anidado en una cohorte de pacientes hospitalizados o ambulatorios de seis meses de edad en adelante con síndrome febril agudo de más de 48 horas y menos de 96 horas de evolución, sin foco aparente después del examen físico, con recuento plaquetario de más de 50.000 por mm³ y con al menos dos de las siguientes manifestaciones: cefalea, dolor retroocular, mialgias, artralgias, exantema, manifestaciones hemorrágicas menores y leucopenia (<5.000/mm³), según la definición operativa de caso sospechoso de dengue de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (16). La infección por el virus del dengue se confirmó mediante alguna de las siguientes pruebas: seroconversión (ELISA IgM en muestra negativa de pacientes en fase aguda y en muestra positiva de los convalecientes), cuadruplicación de títulos de anticuerpos en muestras pareadas, aislamiento viral y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).

El caso se definió como el de un paciente que presentara uno o más de los siguientes hallazgos clínicos: dengue grave o choque por dengue según la definición de 1997 de la OMS (16), hipotensión y sangrado mayor.

El primer grupo de control incluyó pacientes que presentaran uno o más de los siguientes hallazgos clínicos: dengue no grave según la definición de la OMS de 1997 (16), sin hipotensión y sin sangrado mayor. El segundo grupo de control incluyó a pacientes con síndrome febril agudo inespecífico con menos de 96 horas de evolución y diagnóstico de leptospirosis confirmado mediante ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Para el cálculo del tamaño se tuvieron en cuenta los valores de los niveles de VEGF, sICAM-1, endoglina soluble, Ang-1 y Ang-2 encontrados en otra enfermedad febril de potencial curso grave (malaria), pero teniendo en cuenta las diferencias entre malaria cerebral ($p < 0,001$) y malaria no complicada ($p < 0,001$) (17). Con un poder de 90 % y un error alfa de 5 %, en una relación entre caso y controles uno y dos de 1:1:1, se estimó que se requerían 30 pacientes con dengue grave, 30 pacientes con dengue no grave y 30 pacientes con leptospirosis.

Tanto los casos como los controles se agruparon por edad y sexo, y se seleccionaron aleatoriamente. Los niveles de VEGF, sICAM-1, endoglina soluble, Ang-1 y Ang-2 se midieron con estuches comerciales de ELISA (Quantikine Human, R&D Systems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de análisis las constituyeron los sueros (sin anticoagulante) de casos y controles almacenados a -80 °C que nunca hubieran sufrido ciclos de descongelamiento.

Se compararon los niveles de los marcadores estudiados y las variables sociodemográficas y clínicas de casos y controles, en busca de diferencias entre los grupos mediante un análisis bivariado con la prueba de t de Student o de Mann-Whitney según la normalidad en la distribución de las variables continuas y, para las variables categóricas, la prueba de ji al cuadrado.

Se hizo un análisis multivariado mediante el modelo de regresión logística utilizando como variable de salida la gravedad del dengue y, como variables independientes, los niveles de VEGF, sICAM-1, endoglina soluble, Ang-1 y Ang-2, además de las variables clínicas que tuvieron significación estadística en el análisis bivariado y que modificaron en más de 10 % los valores estimados en el modelo. Posteriormente, aquellas variables que tuvieron significación estadística en el análisis multivariado se incluyeron en la escala de predicción de la gravedad estimando el área

bajo la curva ROC, con el fin de determinar su exactitud para la predicción de la gravedad, con o sin los reguladores inflamatorios.

Para el procesamiento y el análisis de los datos se empleó el programa estadístico Stata®, versión 10,0 (Stata Corp).

Este fue un estudio con un riesgo menor al establecido como mínimo en la Resolución 008430 de 1993 expedida por el Ministerio de Salud (18). En el momento de la captación de pacientes y de la toma de muestras, se solicitó el consentimiento informado a ellos, o a sus padres en el caso de los menores de 18 años, así como autorización para almacenar los sueros y emplearlos en estudios posteriores.

Resultados

Los casos de fiebre por dengue y dengue grave se presentaron en su mayoría en mujeres (60 %) y, la mayoría de los casos de leptospirosis (87 %), en hombres. Las medianas de edad en los casos de fiebre por dengue fueron de 24 años, con un rango intercuartílico (RIC) de 10 a 49, y en los de dengue grave, de 31,8 años, con un RIC de 8 a 46, en tanto que en los de leptospirosis fue de 23 años, con un RIC de 7 a 81. La mayoría de los pacientes (30 %) provenía de Bucaramanga, uno de los cinco municipios estudiados.

Los niveles en suero de VEGF, sICAM-1, endogлина soluble, Ang-1 y Ang-2 en los pacientes con leptospirosis, fiebre por dengue y dengue grave, presentaron un comportamiento muy homogéneo, con excepción de los niveles de Ang-2 en los casos de dengue grave (cuadro 1). Con base en el análisis de las cifras crudas comparadas con las medianas, se sugirió que el Ang-2 podría tener un comportamiento diferente ($p=0,096$) (cuadro 1), con una mayor tendencia a concentrar los valores (figura 1).

Al hacer la regresión logística entre la variable de tipo de caso (dengue grave o no) y la variable de la Ang-2, se obtuvo una OR de 1,09 ($IC_{95\%}$ 0,9-

2,3; $p=0,095$). Se hizo, entonces, la regresión nuevamente, pero categorizando los valores de este biomarcador (Angio-2cat) hasta encontrar que en los casos con niveles séricos mayores de 1.490 pg/ml la probabilidad de dengue grave aumentaba tres veces, con una OR de 3,16 ($IC_{95\%}$ 1,2-5,13) y una significación estadística adecuada ($p=0,015$), aunque con una capacidad de predicción o área bajo la curva ROC de 0,62 (figura 2). Los demás reguladores no mostraron relación con el resultado de dengue grave en la población estudiada.

Al comparar el comportamiento de las variables clínicas (cuadro 2), solo algunas de las variables de riesgo de gravedad (hemorragia gastrointestinal, hemorragia genitourinaria, náuseas, vómito, hemorragia nasal, hepatomegalia, exantema, petequias, dolor abdominal, prurito, enrojecimiento de los ojos, o trastorno de conciencia), se relacionaron individualmente con el resultado en la evaluación paso a paso. Sin embargo, solo una de ellas tuvo una adecuada significación estadística

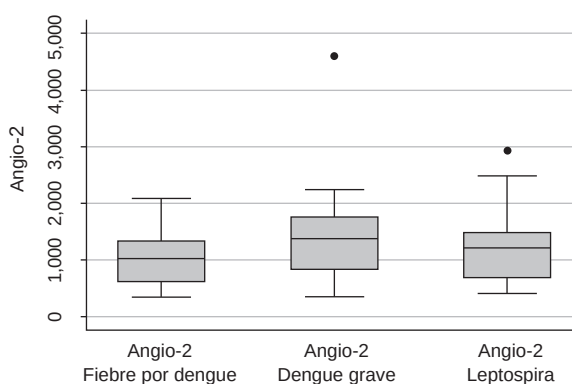


Figura 1. Distribución de Ang-2 según el tipo de caso o control

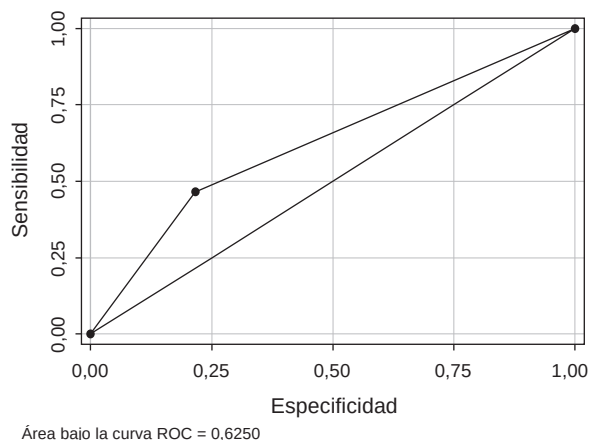


Figura 2. Curva ROC en el modelo bivariado (tipo-caso/Ang-2cat>1.490 ng/ml)

Cuadro 1. Niveles de los reguladores de integridad endotelial en los casos y los controles

Biomarcador	Fiebre por dengue	Dengue grave	Leptospira spp.	p
sICAM*	170,245	19,303	19,703	0,66
Angio1*	716,645	9,960	986,146	0,32
Angio2	10,267	13,825	1,222	0,09
VEGF*	159,754	209,632	229,978	0,66
sEndoglobina*	57,865	6,279	61,465	0,64

*Mediana. Niveles expresados en pg/ml. p: significación estadística

Cuadro 2. Variables clínicas

Variable clínica	Clasificación clínica n (%) (IC _{95%})						Significación estadística			
	Fiebre por dengue			Dengue grave		Leptospira spp.		p		
Cefalea	30	(100)		28	(93)	(77-99)	29	(96)	(82-99)	0,35
Dolor retroocular	23	(76)	(57-90)	24	(80)	(61-92)	20	(66)	(47-82)	0,46
Astenia	20	(66)	(47-82)	26	(86)	(69-96)	23	(76)	(73-97)	0,18
Dolor muscular	29	(96)	(61-92)	28	(93)	(77-99)	27	(90)	(73-97)	0,54
Dolor articular	26	(86)	(69-96)	22	(73)	(54-87)	22	(73)	(54-87)	0,35
Escalofrío	29	(96)	(61-92)	29	(96)	(61-92)	27	(90)	(73-97)	0,42
Disminución del apetito	23	(76)	(73-97)	22	(73)	(54-87)	24	(96)	(82-99)	0,03
Dolor de garganta	9	(30)	(14-49)	13	(43)	(25-62)	18	(60)	(40-77)	0,06
Tos	10	(33)	(17-52)	13	(43)	(25-62)	15	(50)	(31-68)	0,42
Secreción u obstrucción nasal	7	(23)	(9-42)	13	(43)	(25-62)	15	(50)	(31-68)	0,08
Ardor de la piel	5	(16)	(5-34)	9	(30)	(14-49)	5	(16)	(5-34)	0,34
Exantema	11	(36)	(19-56)	16	(53)	(34-71)	8	(26)	(12-45)	0,11
Prurito corporal	15	(50)	(31-68)	10	(33)	(17-52)	6	(20)	(0,7-38)	0,05
Vómito	11	(36)	(19-56)	11	(36)	(19-56)	12	(40)	(22-59)	0,95
Diarrea	14	(46)	(28-65)	9	(30)	(14-49)	9	(30)	(14-49)	0,14
Dolor abdominal	20	(66)	(47-82)	20	(66)	(47-82)	16	(53)	(34-71)	0,46
Visión borrosa	8	(26)	(12-45)	17	(56)	(37-74)	10	(33)	(17-52)	0,04
Mareo	23	(76)	(57-90)	23	(76)	(57-90)	24	(80)	(61-92)	0,93
Visión con luces o estrellas	4	(13)	(3-30)	12	(40)	(22-59)	13	(43)	(25-62)	0,02
Convulsión	0			0			1			0,36
Somnolencia	19	(63)	(43-80)	21	(70)	(50-85)	19	(63)	(43-80)	0,81
Hemorragia gingival espontánea	0			0			1			0,36
Hemorragia gingival no espontánea	5	(16)	(5-34)	5	(16)	(5-34)	2	(6)	(0,08-22)	0,42
Hemorragia nasal espontánea	0			1	(3,3)	(0,008-17)	1	(3,3)	(0,008-17)	0,66
Hemorragia nasal no espontánea	1	(3,3)	(0,008-17)	0			3	(10)	(0,2-26)	0,16
Vómito de sangre oscura	1	(3,3)	(0,008-17)	0			0			0,36
Frecuencia respiratoria >24	3	(10)	(0,2-26)	4	(13)	(3-30)	4	(13)	(3-30)	0,92
Temperatura <37 °C	21	(70)	(50-85)	15	(50)	(31-68)	24	(80)	(61-92)	0,04
Deshidratación	16	(53)	(34-71)	17	(56)	(37-74)	20	(66)	(47,82)	0,55
Alteración de la conciencia	5	(16)	(5-34)	6	(20)	(0,7-38)	1	(3,3)	(0,008-17)	0,13
Eritema facial	12	(40)	(22-59)	15	(50)	(31-68)	8	(26)	(12-45)	0,17
Enrojecimiento de los ojos	10	(33)	(17-52)	12	(40)	(22-59)	9	(30)	(14-49)	0,77
Presión arterial media <70 mm Hg	1	(3,3)	(0,008-17)	2	(6)	(0,08-22)	0			0,35
Presión del pulso <20 mm Hg	0			0			0			
Hipotensión ortostática	2	(6)	(0,08-22)	6	(20)	(0,7-38)	6	(20)	(0,7-38)	0,26
Edema palpebral	6	(20)	(0,7-38)	1	(3,3)	(0,008-17)	1	(3,3)	(0,008-17)	0,82
Derrame pericárdico	0			0			0			
Fiebre	26	(86)	(69-96)	23	(76)	(57-90)	22	(73)	(54-87)	0,70
Derrame pleural	0			0			0			
Hepatomegalia	0			5	(16)	(5-34)	4	(13)	(3-30)	0,75
Dolor abdominal	11	(36)	(19-56)	16	(53)	(34-71)	10	(33)	(17-52)	0,24
Abdomen en tabla	0			0			0			
Prueba de torniquete positiva	14	(46)	(28-65)	15	(50)	(31-68)	11	(36)	(19-56)	0,56
Petequias	2	(6)	(0,08-22)	5	(16)	(5-34)	1	(3,3)	(0,008-17)	0,16

n: número; p: significación estadística

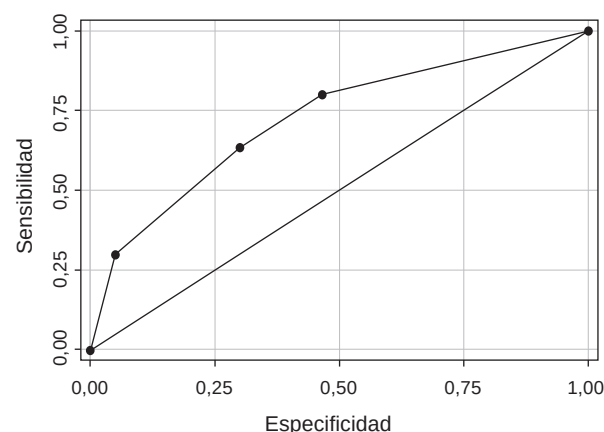
en el modelo de regresión logística. Al asociarse con el exantema, la Ang-2 (mayor de 1.490 pg/ml) mantuvo la misma probabilidad de predecir el dengue grave (OR=3,3), con una OR estimada de 4,24 para que el exantema aumentara dicha probabilidad (IC_{95%} 1,61-11; p=0,03) (cuadro 3), al presentar una mejor capacidad de predicción (área debajo de la curva ROC de 0,72) (figura 3), con una sensibilidad de 30 %, una especificidad de 95 %,

un valor predictivo positivo de 75 % y uno negativo de 73 %. Las demás variables clínicas, a pesar de presentar riesgos estimados (OR) mayores de 2,0, tuvieron intervalos de confianza (95 %) muy amplios y una significación estadística por encima de 0,05 (cuadro 4). Además, se comportaron de manera muy similar entre los grupos de pacientes analizados, con pocas diferencias entre los casos y los controles (p>0,05).

Cuadro 3. Variable clínica predictora en el modelo logístico

Dengue grave	OR	Error estándar	z	p	IC _{95%}
Ang-2cat	3,3	1,74	2,3	0,018	1,17-8,12
Exantema	4,24	2,09	2,93	0,003	1,61-11,1

OR: razón de momios; p: significación estadística; IC_{95%}: intervalo de confianza de 95 %



Área bajo la curva ROC = 0,7236

Figura 3. Curva ROC en el modelo multivariado (tipo-caso/ Ang-2cat/exantema)

A pesar de contar con una sola variable clínica y un solo biomarcador, en el modelo multivariado se observó una mejor capacidad de predicción del dengue grave, lo cual se reflejó en el cambio de 0,62 a 0,72 en el área bajo la curva (figuras 2 y 3).

Discusión

En la última década se han publicado varios estudios sobre el comportamiento de los casos de dengue grave, en los cuales el antecedente clínico de exposición previa al virus del dengue y los signos de fuga plasmática han sido los predictores más aceptados (19,20). Sin embargo, la detección oportuna de quién va a desarrollar la fuga plasmática y cómo tratarla sigue siendo un reto (21).

Se sabe que, en la reacción inmunitaria al virus del dengue, las células vasculares o hematopoyéticas son de vital importancia, y que su comportamiento es similar al de los reguladores inflamatorios y endoteliales que participan en la activación y posterior disfunción endotelial en los procesos autoinmunitarios e infecciosos similares al dengue (15,22). En todos ellos, la fuga plasmática y la hemorragia constituyen la expresión fundamental de la gravedad de los casos y el blanco de la

investigación en torno a herramientas para el tratamiento temprano (7,11,23,24). Específicamente, en un estudio llevado a cabo en el área metropolitana de Bucaramanga por Villar, *et al.*, se determinó la capacidad de algunos biomarcadores para diferenciar entre síndrome febril por dengue y leptospirosis (25). Entre los 19 reguladores evaluados, los niveles de Angptl3, CXCL10, SICAM-1, IL-18BP y endoglina soluble fueron diferentes en los pacientes con una y otra infección ($p=0,001$) (25).

A pesar de que en el presente estudio, el regulador de activación endotelial Ang-2 se expresó con ligeras diferencias en los casos de dengue grave, fiebre por dengue y leptospirosis, siempre se ha comportado de forma diferente en los casos graves y en los que no lo son, y en los sujetos sanos y tanto en enfermedades infecciosas diferentes al dengue como en reacciones homeostáticas de inflamación y coagulación en pruebas de laboratorios (4,26). Se ha observado que los reguladores Ang-1 y Ang-2 en infantes con infecciones graves por dengue tienen un comportamiento característico (disminución en la expresión de Ang-1 y elevación en la de Ang-2) (27).

Se sabe el papel que, conjuntamente con otros reguladores, desempeña la Ang 1 en la integridad vascular, y el hecho de que se almacena en los pericitos y músculo liso de las células endoteliales, así como dentro de las plaquetas (28). En cuanto a la Ang-2, se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade, de donde se libera para los procesos de desestabilización del endotelio por disrupción celular, antagonizando los efectos de la Ang-1 e incrementando la inflamación y la activación endotelial, con la consecuente pérdida de plasma y hemorragia (15,28). Se ha observado que las dos son relevantes en los procesos que desembocan en la gravedad de los pacientes en estado crítico, sin que hasta la fecha se hayan dilucidado completamente los mecanismos de dicha actividad (29).

Cuadro 4. Modelado con otras variables clínicas

Dengue grave	OR	Error estándar	p	IC _{95%}
Ang-2cat	3,22	1,67	0,24	1,16-8,94
Exantema	2,66	1,25	0,032	0,99-6,8
Alteración de la conciencia	2,7	1,84	0,052	0,90-13,7
Dolor abdominal	2,29	1,09	0,057	0,74-5,20

OR: razón de momios; p: significación estadística; IC_{95%}: intervalo de confianza de 95 %

En cuanto a los demás reguladores endoteliales, se ha observado que en poblaciones heterogéneas (modelos animales y pacientes con dengue grave), algunos de ellos se han correlacionado con manifestaciones vasculares e inflamatorias, lo cual podría ser un campo de desarrollo de tratamientos farmacológicos (22,28).

El presente estudio presenta algunas limitaciones en el sentido de que se trató de un estudio de casos y controles retrospectivo, que no alcanzó el poder esperado, pues el tamaño de la muestra no fue lo suficientemente representativo como para extrapolar los resultados a todos los casos graves por edad, sexo, o signos clínicos, y para establecer o descartar más asociaciones entre estos y los reguladores endoteliales.

En conclusión, el aumento de la probabilidad del dengue complicado se relacionó con niveles elevados de Ang-2, habiendo establecido un punto de corte para la población estudiada de 1.490 pg/ml, lo que permite proponer su expresión como predictora independiente de gravedad. Se comprobó, igualmente, la variabilidad de la condición clínica que precede a la gravedad, lo cual abre la puerta al desarrollo de nuevos estudios orientados a entender mejor el papel de los reguladores de la integridad endotelial en el desarrollo de la gravedad en el dengue.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Epidemiológicas de la Universidad Industrial de Santander, Red AEDES.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no tuvieron conflictos de intereses en la realización del estudio ni en la redacción del manuscrito.

Financiación

Este estudio fue financiado por la Universidad Industrial de Santander (convocatoria interna número 5681).

Referencias

1. **World Health Organization.** Dengue and severe dengue. Fecha de consulta: 1º de marzo de 2013. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en>
2. **Bello SL.** Comportamiento epidemiológico del dengue en Colombia, año 2011. Fecha de consulta: 1º de diciembre de 2012. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiológico/Dengue%202011.pdf>
3. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Informe de actividades al Congreso 2012-2013. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2013. p. 76-7. Fecha de consulta: 1º de noviembre de 2013. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Informe%20al%20Congreso%202012-2013.pdf>
4. **Basu A, Chaturvedi UC.** Vascular endothelium: The battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;53:287-99. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00420.x>
5. **Vervaeke P, Vermeire K, Liekens S.** Endothelial dysfunction in dengue virus pathology. *Rev Med Virol.* 2015;25:50-67. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.1818>
6. **Dietmann A, Helbok R, Lackner P, Fischer M, Reindl M, Lell B, et al.** Endoglin in African children with *Plasmodium falciparum* malaria. A novel player in severe malaria pathogenesis? *J Infect Dis.* 2009;200:1842-8. <http://dx.doi.org/10.1086/648476>
7. **Conroy AL, Gélvez M, Hawkes M, Rajwans N, Liles WC, Villar-Centeno LA, et al.** Host biomarker distinguish dengue from leptospirosis in Colombian: A case-control study. *BMC Infect Dis.* 2014;14:35. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-14-35>
8. **van Meurs M, Kumpers P, Ligtenberg JJ, Meertens JH, Molema G, Zijlstra JG.** Bench-to-bedside review: Angiopoietin signalling in critical illness – a future target? *Crit Care.* 2009;13:207. <http://dx.doi.org/10.1186/cc7153>
9. **Michels M, van der Ven AJ, Djamiatun K, Fijnheer R, de Groot PG, Griffioen AW, et al.** Imbalance of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in severe dengue and relationship with thrombocytopenia, endothelial activation, and vascular stability. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87:943-6. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0020>
10. **Ong SP, Ng ML, Chu JJ.** Differential regulation of angiopoietin 1 and angiopoietin 2 during dengue virus infection of human umbilical vein endothelial cells: Implications for endothelial hyperpermeability. *Med Microbiol Immunol.* 2013;202:437-52. <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-013-0310-5>
11. **Srikiatkhachorn A, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Kalayanaroj S, Libraty DH, Green S, et al.** Virus-induced decline in soluble vascular endothelial growth receptor 2 is associated with plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *J Virol.* 2007;81:1592-600. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01642-06>
12. **van de Weg CA, Pannuti CS, van den Ham HJ, de Araújo ES, Boas LS, Felix AC, et al.** Serum angiopoietin-2 and soluble VEGF receptor 2 are surrogate markers for plasma leakage in patients with acute dengue virus infection. *J Clin Virol.* 2014;60:328-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.05.001>
13. **Lawson C, Wolf S.** ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep.* 2009;61:22-32.
14. **Khongphatthanayothin A, Phumaphuti P, Thongchaiprasit K, Poovorawan Y.** Serum levels of sICAM-1 and sE-selectin in patients with dengue virus infection. *Jpn J Infect Dis.* 2006;59:186-8.
15. **Page AV, Liles WC.** Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence* 2013;4:507-16. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.24530>
16. **World Health Organization.** Clinical diagnosis. En: Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control. Second edition. Geneva: WHO; 1997. p. 12-23.

Fecha de consulta: 11 de agosto de 2012. Disponible en: <http://www.who.int/entity/csr/resources/publications/dengue/012-23.pdf>

17. **Conroy AL1, Lafferty EI, Lovegrove FE, Krudsood S, Tangpukdee N, Liles WC, et al.** Whole blood angiopoietin-1 and -2 levels discriminate cerebral and severe (non-cerebral) malaria from uncomplicated malaria. *Malar J.* 2009;8:295. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-8-295>
18. **Ministerio de Salud.** Resolución N° 0008430 de 1993. República de Colombia, 1993. Fecha de consulta: 23 de septiembre de 2012. Disponible en: https://www.invima.gov.co/images/pdf/medicamentos/resoluciones/etica_res_8430_1993.pdf
19. **Conroy A, Gélvez M, Hawkes M, Rajwans N, Tran V, Liles WC, et al.** Host biomarkers are associated with progression to dengue haemorrhagic fever: A nested case-control study. *Int J Infect Dis.* 2015;40:45-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2015.07.027>
20. **Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen VV, Wills B.** Dengue. *N Engl J Med.* 2012;366:1423-32. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1110265>
21. **Srikiatkachorn A, Kelley JF.** Endothelial cells in dengue hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 2014;109:160-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.07.005>
22. **Spiropoulou C, Srikiatkachorn A.** The role of endothelial activation in dengue hemorrhagic and hantavirus pulmonary syndrome. *Virulence.* 2013;4:525-36. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.25569>
23. **Tseng CS, Lo HW, Teng HC, Lo WC, Ker CG.** Elevated levels of plasma VEGF in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;43:99-102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsim.2004.10.004>
24. **Azizan A, Sweat J, Espino C, Gemmer J, Stark L, Kazanis D.** Differential proinflammatory and angiogenesis-specific cytokine production in human pulmonary endothelial cells, HPMEC-ST1.6R infected with dengue-2 and dengue-3 virus. *J Virol Methods.* 2006;138:211-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.010>
25. **Villar-Centeno LA, Lozano-Parra A, Salgado-García D, Herrán O.** Alteraciones bioquímicas como marcadores predictores de gravedad en pacientes con fiebre por dengue. *Biomédica.* 2013;33:63-9. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.732>
26. **Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, et al.** The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood.* 2004;103:4150-6. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-10-3685>
27. **Giuliano JS Jr, Lahni PM, Harmon K, Wong HR, Doughty LA, Carcillo JA, et al.** Admission angiopoietin levels in children with septic shock. *Shock.* 2007;28:650-4. <http://dx.doi.org/10.1097/shk.0b013e318123867b>
28. **Dalrymple NA, Mackow ER.** Roles for endothelial cells in dengue virus infection. *Adv Virol.* 2012;2012:840654. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/840654>
29. **Ricciuto DR, dos Santos CC, Hawkes M, Toltl LJ, Conroy AL, Rajwans N, et al.** Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 as clinically informative prognostic biomarkers of morbidity and mortality in severe sepsis. *Crit Care Med.* 2011;39:702-10. <http://dx.doi.org/10.1097/CCM.0b013e318206d285>

ARTÍCULO ORIGINAL

La infección con el virus del dengue induce apoptosis en células del neuroblastoma humano SH-SY5Y

Jaime E. Castellanos^{1,2}, José I. Neissa¹, Sigrid J. Camacho¹

¹ Grupo de Virología, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de Patógenos Infecciosos, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El dengue es una enfermedad humana producida por el virus del mismo nombre, que se transmite por la picadura de mosquitos del género *Aedes*. La infección tiene una amplia gama de presentaciones clínicas que van desde la ausencia de síntomas hasta los casos fatales y afecta principalmente a la población pediátrica. Según la nueva clasificación de la enfermedad, las manifestaciones neurológicas se consideran un criterio para el diagnóstico del dengue grave.

Objetivo. Evaluar los posibles mecanismos involucrados en la aparición de los signos neurológicos en una línea celular de neuronas humanas, como modelo de infección con el virus del dengue del serotipo 2 (DENV-2).

Materiales y métodos. Se evaluó la sensibilidad y la permisividad de la línea celular SH-SY5Y a la infección por el DENV-2; se encontró que la proporción entre infección y producción viral era similar a las de las células de primates usadas como control positivo de la infección.

Resultados. La infección indujo un efecto citopático en la línea celular de neuroblastoma caracterizado por un proceso de muerte apoptótica, con aumento en la proporción de células positivas al emplear los métodos de anexina V y TUNEL. Se encontró una regulación positiva del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y el tratamiento con un anticuerpo anti-TNF- α aumentó ligeramente la supervivencia de las células infectadas. La adición de TNF- α exógeno a los cultivos infectados potenció la muerte celular.

Conclusión. Estos resultados sugieren, en su conjunto, que la regulación positiva del TNF- α podría hacer parte del proceso que induce daño y muerte celular durante el desarrollo de la encefalitis por dengue.

Palabras clave: dengue, apoptosis, factor de necrosis tumoral alfa, supervivencia celular, manifestaciones neurológicas, encefalitis.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2984>

Dengue virus induces apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells

Introduction: Dengue is a human disease caused by a virus with the same name, which is transmitted by the bite of *Aedes* mosquitoes. The infection has a wide range of clinical presentations ranging from asymptomatic to fatal cases, with the pediatric population being the most susceptible. According to the new classification of the disease, the neurological manifestations are considered a criterion for the diagnosis of severe dengue.

Objective: To evaluate the possible mechanisms involved in the onset of neurological signs in a cell line of human neurons as a model of infection with dengue virus type 2 (DENV-2).

Materials and methods: Susceptibility and permissiveness of the SH-SY5Y line to infection by DENV-2 was analyzed, showing that the proportions of viral infection and production are similar to those of primate cells used as positive control for infection.

Results: Infection induced a cytopathic effect on the neuroblastoma line characterized by apoptotic cell death process, increasing the proportion of annexin V and TUNEL positive cells and an upregulation of TNF- α . Treatment with anti-TNF- α antibody increased slightly cell survival of infected cells. The addition of exogenous TNF- α to the infected cultures enhanced cell death.

Conclusion: These results as a whole suggest that the upregulation of TNF- α could be part of the process that induces cell damage and death in cases of dengue encephalitis.

Key words: Dengue, apoptosis, tumor necrosis factor-alpha, cell survival, neurologic manifestations, encephalitis.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2984>

Contribución de los autores:

Jaime E. Castellanos: ejecución del proyecto, análisis e interpretación de datos

José I. Neissa: aplicación de la metodología

Sigrid J. Camacho: análisis e interpretación de datos

Todos los autores participaron en la redacción del manuscrito.

El virus del dengue (DENV) es un flavivirus que se transmite por la picadura de mosquitos hembra de la especie *Aedes aegypti* (1). La infección causa una enfermedad febril de resolución espontánea que en algunas ocasiones se presenta como un cuadro grave que puede conducir a la muerte (2). Colombia es uno de los países de Latinoamérica con mayores tasas anuales de dengue debido a que en la mayor parte del territorio nacional circulan tanto el vector como los cuatro serotipos del virus (DENV 1 al 4) (3).

Previamente, la enfermedad por dengue se clasificaba como dengue clásico o dengue hemorrágico, este último con signos graves de pérdida plasmática y choque hipovolémico. Con base en la experiencia de diversos centros de atención clínica en el mundo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) planteó una nueva clasificación de la enfermedad que incluye criterios adicionales para el diagnóstico (4). El amplio espectro de manifestaciones clínicas se agrupó en dos categorías: dengue (con signos de alarma y sin ellos) y dengue grave, el cual se caracteriza por el aumento de la permeabilidad vascular, extravasación de plasma, hemorragias graves y la alteración de la función de órganos como el hígado, el corazón o el cerebro (4). En este último caso, condiciones como la hepatitis, la miocarditis o los síntomas neurológicos, se convierten en los signos centrales para el diagnóstico, más allá de las hemorragias (5,6).

Desde hace más de una década, los pediatras colombianos venían observando que alrededor de 8 % de los pacientes con dengue grave presentaban alteraciones neurológicas durante la infección o después de ella (7). Esta cifra es similar a la que recientemente se reportó en 7,4 % de los pacientes de un estudio en India (8). Hay gran controversia acerca de si los signos neurológicos asociados a la infección por el DENV se deben a infección directa del tejido nervioso o si son el resultado de la disfunción nerviosa asociada al daño o la falla en sistemas diferentes al neurológico (como ocurre, por ejemplo, en la encefalopatía hepática), o si se deben a la presencia y la circulación constante de mediadores inflamatorios sistémicos o al aumento de los niveles de metabolitos durante la infección,

lo cual modula la función neurológica (9). En un estudio recientemente publicado, se confirmó la etiología viral en 93 de los 291 pacientes mayores de 15 años con diagnóstico de infección del sistema nervioso central, y el virus de la encefalitis japonesa fue el más frecuente (36 casos), en tanto que el segundo virus más frecuentemente detectado en el líquido cefalorraquídeo fue el DENV (19 casos); en 80 % de estos, la encefalitis fue el único signo orientador del diagnóstico de dengue grave (10).

Los signos neurológicos que se han reportado incluyen desde cefaleas intensas y vómito en niños, hasta alteraciones de la conciencia o la conducta, convulsiones, polineuropatías, síndrome de Guillain-Barré y mielitis transversa (11); en varios casos se ha podido encontrar ARN viral o anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo, lo cual demuestra replicación en el sistema nervioso (12).

Se ha propuesto que la apoptosis y la regulación excesiva de citocinas estarían implicadas en el daño neuronal por la infección con dengue (13,14). Sin embargo, la relación entre estos dos procesos no ha sido aclarada aún y no se sabe cómo las citocinas podrían estar involucradas en el daño neurológico. Entre las citocinas que se han visto reguladas de forma exacerbada en el cerebro de ratones como reacción a la infección por el virus del dengue, se encuentra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), además del interferón (IFN) alfa y la interleucina 1 alfa (IL-1 α) (14), lo cual plantea la posibilidad de que la regulación excesiva del TNF- α y el efecto consecuente sean parte del daño secundario infligido por el virus.

En estudios previos hemos descrito la sensibilidad de la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y a la infección por dengue (15), por lo cual en el presente trabajo se la utilizó en un modelo de infección neuronal por DENV del serotipo 2, el cual se reporta frecuentemente asociado a condiciones neurológicas (8,12,16) y, además, históricamente es el más frecuente en las Américas y en Colombia (17), con el propósito de evaluar la muerte celular como reacción a la infección.

Materiales y métodos

Células y cultivo celular

Se utilizaron las células comerciales SH-SY5Y (Cat. CRL-2266, ATCC), que son fenotípicamente neuronales y se han aislado a partir de la metástasis ósea de un neuroblastoma humano. Esta sublínea celular proviene de las células SK-N-SH y SK-SH5Y, ambas reportadas previamente como

Correspondencia:

Jaime E. Castellanos, Grupo de Virología, Universidad El Bosque, Avenida Carrera 9 N° 131A-02, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 648 9066 Fax: (571) 625 2030
castellanosjaime@unbosque.edu.co

Recibido: 28/07/15; aceptado: 14/04/16

sensibles a la infección por dengue (18,19). Los experimentos se realizaron durante los pasajes 6 a 15. En algunos experimentos se utilizaron como controles positivos las células LLC-MK2 de riñón de *Macaca mulatta* (mono *Rhesus*), de morfología epitelial, ampliamente reconocidas como sensibles a la infección por el virus del dengue. Todas las células se mantuvieron en medio DMEM con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin), en un ambiente de CO₂ al 5 % y una temperatura de 37 °C. Se confirmó que todos los cultivos celulares estuvieran libres de *Mycoplasma* spp. y se evaluaron diariamente mediante observación en el microscopio invertido.

Virus, infección y cuantificación del factor de necrosis tumoral alfa

Las infecciones se hicieron con DENV-2 proveniente del aislamiento clínico de un paciente (COL-789, pasaje 8), donado por el Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud de Colombia, el cual se cosechó en células C6/36 de *Aedes albopictus* en nuestro laboratorio y se confirmó por secuenciación.

La titulación viral (1,2 x 10⁵ UFP/ml) se calculó evaluando la formación de placas de lisis en células LLC-MK2 de diluciones seriadas del inóculo. Con base en dicha titulación, se infectaron las células SH-SY5Y durante una hora con una multiplicidad de infección de 1, 0,5 o 0,1 (MOI: 1, MOI: 0,5 o MOI: 0,1); posteriormente, se retiró el inóculo y se permitió la infección durante uno a cuatro días. Como control se simuló una infección utilizando lisados de células C6/36 no infectados y, en algunos experimentos, con DENV-2 inactivados por rayos ultravioleta durante una hora.

Los cultivos infectados y los controles se evaluaron diariamente en el microscopio invertido para detectar la presencia del efecto citopático o de cambios relacionados con la muerte celular, tales como desprendimiento, pérdida de volumen, aumento de la refracción, disminución de la densidad del cultivo o aparición de morfología anormal.

Las concentraciones del TNF-α en los sobrenadantes de los cultivos se cuantificaron mediante el sistema de ELISA DuoSet (Cat. DY210 R&D Systems), el cual usa un anticuerpo de captura; tras añadir las muestras, se agregó el anticuerpo de detección biotinilado más peroxidasa acoplada a estreptavidina. La concentración se halló haciendo la extrapolación en una curva estándar de concentraciones conocidas.

Inmunofluorescencia e inmunocitoquímica indirectas

Se evaluó la presencia de antígeno viral en el interior de las células SH-SY5Y mediante técnicas de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia indirectas y utilizando un anticuerpo monoclonal antilavivirus (Cat. MAB8744, Chemicon), el cual reconoce eficientemente la proteína de envoltura de todos los flavivirus (20) y ha demostrado su utilidad tanto en células como en tejidos (21). Como control negativo se emplearon células SH-SY5Y inoculadas para simular la infección y, como control positivo, células LLC-MK2, cuya sensibilidad frente a la infección por el virus del dengue es ampliamente reconocida.

Se implementó un protocolo de inmunoperoxidasa en el cual las células se sembraron sobre laminillas de vidrio tratadas previamente con *EHS Cell Attachment Matrix* (Cat. G5971, Promega); a las 48 horas de infección se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 30 minutos y a continuación se les aplicó una protección con gelatina al 1 %. Se hizo la permeabilización y la inactivación de peroxidasas endógenas y, posteriormente, se bloquearon los sitios inespecíficos con suero de bovino recién nacido al 10 % en solución tampón fosfato salina (PBS), se adicionó el anticuerpo primario antilavivirus y, después de lavar con PBS, se agregó un anticuerpo secundario biotinilado producido en cabra (Cat. BA-9200, Vector); por último, se agregó estreptavidina acoplada a peroxidasa (Cat. SA-5004, Vector) durante 30 minutos y se hizo un revelado usando una mezcla en una proporción de 1:1 de H₂O₂ al 0,02 % y diaminobenzidina en solución tampón Tris-HCl.

Después de colorear y deshidratar las células, se montaron en láminas para su observación en el microscopio y se fotografiaron con una cámara digital Nikon Coolpix 995. Para obtener los porcentajes de infección, se fotografiaron ocho campos en tres laminillas diferentes de tres réplicas independientes, y se contaron las células totales y aquellas que estaban marcadas para el antígeno del DENV (n=9).

El protocolo utilizado durante la inmunofluorescencia fue similar: el anticuerpo secundario en este caso fue un anti-IgG de ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Cat. 74641, Sanofi), con dilución de 1/20 en suero de bloqueo (de bovino recién nacido) al 5 % en PBS, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se hicieron dos lavados con PBS y uno con agua.

destilada antes de hacer el montaje con glicerol. Las muestras se observaron y se fotografiaron en un microscopio de fluorescencia (Laborlux, Leitz).

Formación indirecta de placas

Para evaluar la adsorción y la penetración del DENV en las células de neuroblastoma (sensibilidad), se utilizó una técnica reportada previamente en hepatocitos por Chingsuwanrote, *et al.* (22), la cual permite obtener un dato confiable y lineal en células que no forman monocapa. Las células SH-SY5Y se inocularon con una MOI:1 a 37 °C para permitir la adhesión y la penetración del virus durante dos horas, al cabo de las cuales se retiró el inóculo y se aplicó un tratamiento con glicina ácida (pH 3,0) durante un minuto para inactivar los virus que no lograron penetrar la célula.

Después de la infección, las células se desprendieron con tripsina al 0,2 % en PBS, se contaron en una cámara de Neubauer y se hicieron diluciones que luego se sembraron sobre una monocapa confluyente de células LLC-MK2; se dejaron en adhesión durante cuatro horas para después retirar el sobrenadante y agregar un medio de recubrimiento que evita la dispersión del virus y permite, por ello, la formación de placas de lisis. Este medio contenía suero fetal bovino al 6,2 %, el medio DMEM, bicarbonato al 7,5 % y carboximetilcelulosa al 3 %. La formación de placas se evaluó siete días después mediante tinción de las monocapas con cristal violeta.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Se extrajo ARN total utilizando el reactivo Trizol® (Gibco) a partir de células infectadas y no infectadas, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN purificado se trató con la endonucleasa DNase I (Cat. 18047-019, Invitrogen) en una solución tampón de digestión. Luego se hizo una nueva purificación del ARN con una mezcla de fenol/cloroformo/isoamil-alcohol. El ARN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro a 260 nm.

A partir de 500 ng de ARN se hizo una transcripción inversa utilizando cebadores aleatorios (25 µg/µl) y la enzima M-MLV (200 U/ml) (Cat. M170A, Promega) a 42 °C durante una hora. A partir de este ADN complementario, se hizo la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real en presencia de la molécula SYBR Green (kit Dynamo HS, Finnzymes) y utilizando el equipo GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer).

La reacción tuvo un volumen final de 20 µl que contenían 4 µl de ADN complementario de plantilla, 10 µl de la Master Mix 2X (ADN polimerasa de *Thermus brockianus*, SYBR Green I, solución tampón de PCR optimizada, 5 mM de MgCl₂ y desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) incluidas las desoxiuridinas trifosfato (dUTP), 0,4 µl de colorante ROX y 0,1 µM de cebadores de sentido y antisentido.

La especificidad del producto amplificado se corroboró mediante el análisis de la curva de disociación del producto. Se hizo una cuantificación relativa después de normalizar las muestras con la expresión del gen de β-actina utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, según el protocolo establecido previamente en nuestro laboratorio (23).

Los cebadores específicos fueron los siguientes: para el gen β-actina, B-act F 5'-GAT CAT TGC TCC TCC TGA GC y B-act R 5'-ACT CCT GCT TGC TGA TCC AC; para la detección del ARN del DENV-2, DV2F 5'-TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G y DV2R 5'-CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG (24); para la cuantificación de los mensajeros de citocinas, IL1bF 5'-TTG AAA GAT GAT AAG CCC ACT CTA y IL1bR 5'-CAG ACT CAA ATT CCA GCT TGT TA; para IL-6 se usaron IL6F 5'-GAC AGC CAC TCA CCT CTT CA y IL6R 5'-CCT CTT TGC TGC TTT CAC AC, y para el TNF-α, los cebadores TNFR 5'-CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT y TNFF 5'-AGG GCA ATG ATC CCA AAG TA.

Prueba de viabilidad celular

Para cuantificar la viabilidad celular se llevó a cabo una prueba de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, cat. M5655, Sigma), el cual es originalmente de color amarillo y, cuando se reduce a formazán, toma un color violeta mediante una reacción enzimática por la acción de deshidrogenasas celulares, lo cual permite demostrar la integridad metabólica.

Las células se sembraron en cajas de 96 pozos y se inocularon con DENV-2 o con el control; a continuación, se incubaron por 24, 48, 72 y 96 horas, y para evaluar la viabilidad, se les añadió MTT disuelto en DMEM fresco en una concentración final de 1 mg/ml, y se las incubó a 37 °C durante dos horas. Después de la corroboración microscópica de la formación de cristales de formazán, estos se disolvieron con la adición de 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) y se cuantificó la absorbancia de cada pozo en 570 nm.

Método TUNEL

Se utilizó el método TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) para detectar la fragmentación del ADN, la cual es signo de apoptosis, utilizando para su posterior detección la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), la cual marca dichos fragmentos incorporando dUTP biotinilados en los extremos 3'.

Las células se sembraron en laminillas de vidrio tratadas previamente con poli-L-lisina y, después de 48 horas, se fijaron y permeabilizaron para incubarlas con la enzima TdT recombinante (Cat. 3333574, Roche) en una concentración de 0,5 U/ml y en presencia de 0,2 nM de dUTP biotinilado en 2,5 mM de solución tampón de reacción y CoCl_2 , según lo recomendado por el fabricante. Se añadió, finalmente, estreptavidina acoplada al fluorocromo CY3 y, después de lavar, se hizo un montaje húmedo para visualizar y contar las células en el microscopio de fluorescencia.

Como control positivo se utilizaron células permeabilizadas y tratadas con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNasa I durante 15 minutos a 37 °C. Como control negativo se utilizaron cultivos de células SH-SY5Y no infectados. Los núcleos positivos se contaron en, al menos, cuatro campos diferentes hasta completar un mínimo de 500 células en tres experimentos independientes, y los datos se expresaron como el porcentaje de células positivas por el método TUNEL.

Ensayo de fragmentación del ADN

Se extrajo el ADN de las células SH-SY5Y y se separó en un gel de agarosa para determinar la presencia del patrón en escalera característico de la apoptosis (*DNA laddering*), utilizando un procedimiento previamente descrito (25). Para ello, se sembraron 50.000 células por pozo en cajas de 12 pozos y 48 horas después de infectadas con DENV-2 se recolectaron y se les agregó 20 μl de solución tampón de lisis (2 mM de EDTA/100mM Tris-Cl, pH 8,0/0,8 % de SDS) y, a continuación, 2 μl de ribonucleasa A (50 mg/ml), mezcla que se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 10 μl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó durante dos horas a 50 °C, después de lo cual se agregaron 4 μl de solución tampón de carga azul de bromofenol 10X. Las muestras se separaron en una electroforesis en agarosa SeaKem al 1,8 % que contenía 0,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio, para su observación en un transiluminador UV.

Evaluación de la integridad de la membrana y de la externalización de la fosfatidilserina

Se evaluó la iniciación del proceso apoptótico y se lo cuantificó mediante el uso de anexina V acoplada a FITC; se cuantificaron, asimismo, las células necróticas mediante tinción con yoduro de propidio (Cat. Annex100F, AbD Serotec) en un citómetro de flujo, utilizando el protocolo recomendado por el fabricante.

En resumen, las células se desprendieron mediante tratamiento con tripsina al 0,2 % en PBS durante un minuto. Después de lavarlas, 10^6 células/ml se suspendieron de nuevo en 190 μl de solución tampón de unión, y se agregaron 4 μl de anexina V-FITC y 6 μl de yoduro de propidio, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; a continuación, la muestra se incubó durante 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y se pasó por un citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson). Como control positivo se utilizaron células SH-SY5Y expuestas a formaldehído al 4 % en solución tampón de unión durante 30 minutos, según la indicación del fabricante. Como control negativo se utilizaron células SH-SY5Y sin ningún tratamiento y marcadas con anexina V e IP.

Ensayos de adición y neutralización del factor de necrosis tumoral alfa

En estos ensayos se utilizó el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) recombinante humano expresado en levadura (Cat. T0157, Sigma). Se empleó el anticuerpo monoclonal neutralizador anti- $\text{TNF-}\alpha$ (R&D Systems. Cat. MAB610).

Se sembraron $1,4 \times 10^5$ células por pozo en cajas de 24 pozos; 24 horas después, se retiró el suero según un protocolo previamente descrito (26) y, al cabo de otras 24 horas, se hicieron infecciones con MOI de 1, 0,5 o 0,1; después de 90 minutos de adhesión y adsorción viral, se retiró el sobrenadante y se cambió por $\text{TNF-}\alpha$ recombinante humano en diferentes concentraciones disuelto en DMEM con SFB al 2,5 % y albúmina sérica bovina al 0,25 %.

En los ensayos de neutralización, el $\text{TNF-}\alpha$ recombinante y el anticuerpo anti- $\text{TNF-}\alpha$ se dejaron en incubación durante dos horas a temperatura ambiente antes de agregarlos al cultivo. Pasadas 3 y 24 horas, las células se desprendieron con tripsina al 0,2 % para su análisis mediante citometría de flujo usando la marcación con anexina V y yoduro de propidio, según el protocolo descrito anteriormente.

Análisis estadístico

Los porcentajes obtenidos con el método TUNEL se sometieron a una transformación angular y, previa aplicación del test de Levene, se hizo una ANOVA de una vía seguida del test *post hoc* T3 de Scheffe. Un valor de *p* menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Las células SH-SY5Y son sensibles a la infección por DENV-2.

En la evaluación mediante inmunoperoxidasa a las 48 horas de la infección se observó que más de 90 % de las neuronas eran positivas para el antígeno viral (figura 1A), el cual se ubicó alrededor del núcleo (figura 1C). En la figura 1B se muestra el aspecto de las células inoculadas en la infección simulada y procesadas con inmunoperoxidasa. En la inmunofluorescencia se pudo ver la intensa marcación citoplásmica (figura 1D), la cual reflejó la abundancia del antígeno. Se cuantificó el genoma viral mediante una PCR en tiempo real a partir del ARN obtenido de una monocapa de células SH-SY5Y infectadas. El resultado mostró mayor cantidad de ARN viral a las 48 que a las 24 horas de la infección (C_T 25,3±1,4 Vs. 29,6±2,1) (figura 1E).

Mediante un ensayo de formación indirecta de placas se evaluó si las neuronas SH-SY5Y permitían la replicación del DENV-2 liberando viriones infecciosos al medio. Debido a que estas células crecen formando cúmulos que fácilmente se desprenden y que no alcanzan una confluencia de 100 %, es imposible hacer una formación convencional de placas, por lo que se hizo una indirecta.

Las células SH-SY5Y inoculadas con DENV-2 liberaron viriones que formaron placas de lisis sobre las monocapas de LLC-MK2. El número de placas indirectas producidas por las células SH-SY5Y fue ligeramente mayor que el número de placas indirectas producidas por las células LLC-MK2 infectadas con igual MOI y aplicadas sobre monocapas de esta misma línea celular (figura 2A y B). El porcentaje de células SH-SY5Y infectadas (2,5 %) fue superior al de las células LLC-MK2 (1,0 %) infectadas bajo las mismas condiciones (figura 2C). El número de placas indirectas formadas por la inoculación de células SH-SY5Y sobre células LLC-MK2 aumentó significativamente a partir de las 12 horas de la infección (figura 2D), lo cual indica que la liberación de la primera progenie del virus ocurrió entre las ocho y las 12 horas de la inoculación.

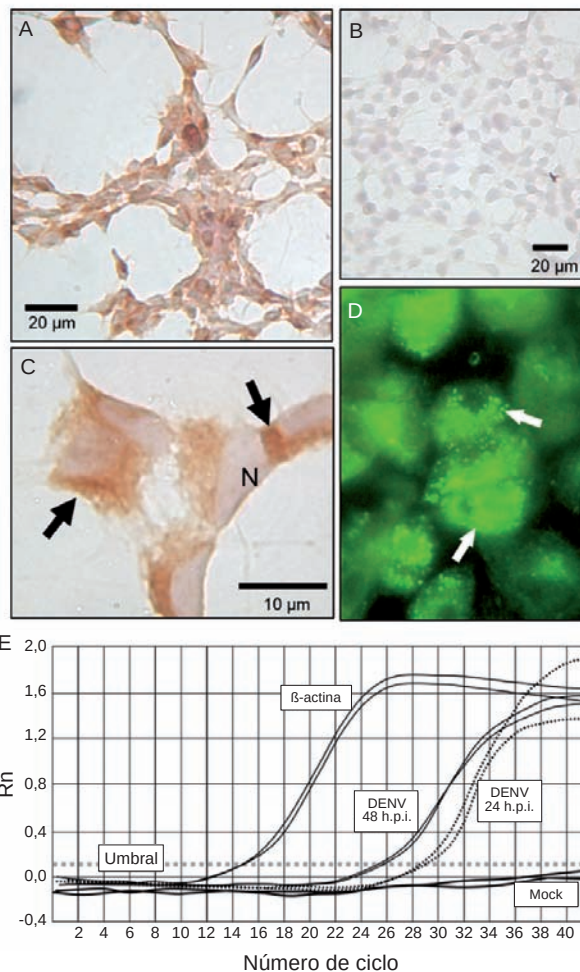


Figura 1. Localización de antígenos del DENV-2 en células SH-SY5Y. **A.** Detección de DENV-2 mediante inmunoperoxidasa a las 48 horas de la infección. **B.** Detalle ampliado de la localización citoplásmica y perinuclear de los antígenos virales (flechas); N: núcleo. **C.** Control de células inoculadas en la infección simulada y procesadas para inmunocitoquímica. **D.** Aspecto de la detección mediante inmunofluorescencia en células SH-SY5Y infectadas con el mismo procedimiento descrito en A. Las flechas indican células infectadas. Se observa claramente el patrón de marcación vesicular en la zona del aparato de Golgi. **E.** Cuantificación del ARN viral en células infectadas. Nótese la aparición del C_T en las neuronas infectadas a las 48 horas y la ausencia de amplificación en los cultivos inoculados en la infección simulada.

Este resultado confirmó que las células SH-SY5Y son sensibles a la infección por el DENV-2 y que constituyen un buen modelo de neuroinfección *in vitro*.

Las células SH-SY5Y disminuyen su viabilidad tras la infección con DENV-2.

Durante la infección se observaron cambios morfológicos indicativos del efecto citopático en las células SH-SY5Y. A las 72 horas de la infección,

se observó pérdida de células adheridas, aumento del número de cúmulos, pérdida de la morfología poligonal y su reemplazo por una morfología redondeada, reducción en el número de neuritas, y citoplasmas con vesículas (figura 3).

Todo lo anterior sugiere que la infección con DENV-2 inicia un proceso de muerte celular que culmina con la lisis o destrucción de la membrana. Se confirmaron estos hallazgos evaluando la viabilidad con la prueba de MTT. Como se muestra en la figura 3B, a las 96 horas, la infección con el DENV-2 indujo una importante disminución de la viabilidad celular de, aproximadamente, 50 % con una MOI de 1, de 45 % en una MOI de 0,5 y de 36 % en una MOI de 0,1, con respecto al control sin infectar. Curiosamente, durante las primeras 24 horas de infección se observó una tendencia al incremento en la absorbancia. No se observaron cambios en la medición de los cultivos inoculados en la infección simulada o con inóculos inactivados por radiación ultravioleta.

La infección con DENV-2 induce la expresión del TNF- α en las células SH-SY5Y.

En las células SH-SY5Y infectadas con DENV-2 se encontró una regulación positiva en la transcripción y la traducción del TNF- α , en comparación con las células inoculadas en la infección simulada. A las 48 horas de la infección la regulación del mensajero fue 24 veces mayor en los cultivos infectados con el virus que en los infectados de forma simulada (figura 4A). No obstante, la transcripción de las citocinas inflamatorias IL-1 β e IL-6 no se vio modificada de forma sustancial, lo cual indica que la expresión exacerbada del TNF- α es un fenómeno específico. A las 48 de la infección, la concentración del TNF- α en los cultivos infectados fue significativamente mayor que en los cultivos inoculados en la infección simulada. Los niveles de esta citocina fueron mayores en los cultivos infectados con una MOI de 1 que con una de 0,5 (figura 4B)

La infección con el DENV-2 induce apoptosis en las células SH-SY5Y.

Algunas de las características morfológicas observadas previamente podrían ser indicativas de la activación de un mecanismo apoptótico durante la infección de las células SH-SY5Y por el DENV-2 y, por esa razón, se evaluó la muerte neuronal apoptótica. En los cultivos con infección por el DENV-2 se incrementó sustancialmente el número de células positivas al aplicar el método TUNEL y

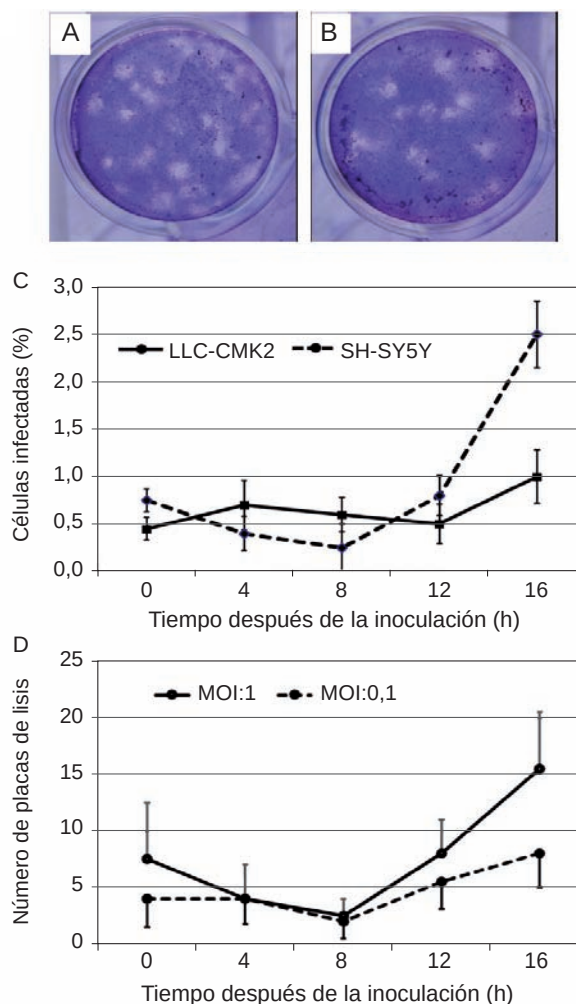


Figura 2. Evaluación de la sensibilidad de las células SH-SY5Y a la infección por el DENV-2. **A.** Aspecto de las placas obtenidas por formación indirecta de placas a partir de neuronas SH-SY5Y inoculadas en diferentes tiempos y sembradas de nuevo sobre monocapas de células LLC-MK2. **B.** Placas de lisis obtenidas con el mismo procedimiento, pero en este caso de células LLC-MK2 sembradas nuevamente sobre monocapas de LLC-MK2. **C.** Conteo del número de células LLC-MK2 infectadas después de sembrar nuevamente neuronas o LLC-MK2 inoculadas en una MOI de 1 y en diferentes tiempos (n=3). Se observa que la salida de virus es más abundante en las neuronas SH-SY5Y. **D.** Evaluación de la sensibilidad (adsorción más entrada) del DENV-2. Número de placas de lisis producidas por neuronas SH-SY5Y inoculadas en diferentes tiempos con MOI de 0,1 y de 1 (n=3).

el número en los cultivos inoculados con una MOI de 1 fue mayor que en aquellos con una de 0,1 (figura 5A).

Los porcentajes de células positivas con el método TUNEL para el control inoculado en la infección simulada, y el de las inoculadas con una MOI de 0,1 y una de 1 fueron de 1,2 %, 6,1 % y 24,2 %, respectivamente.

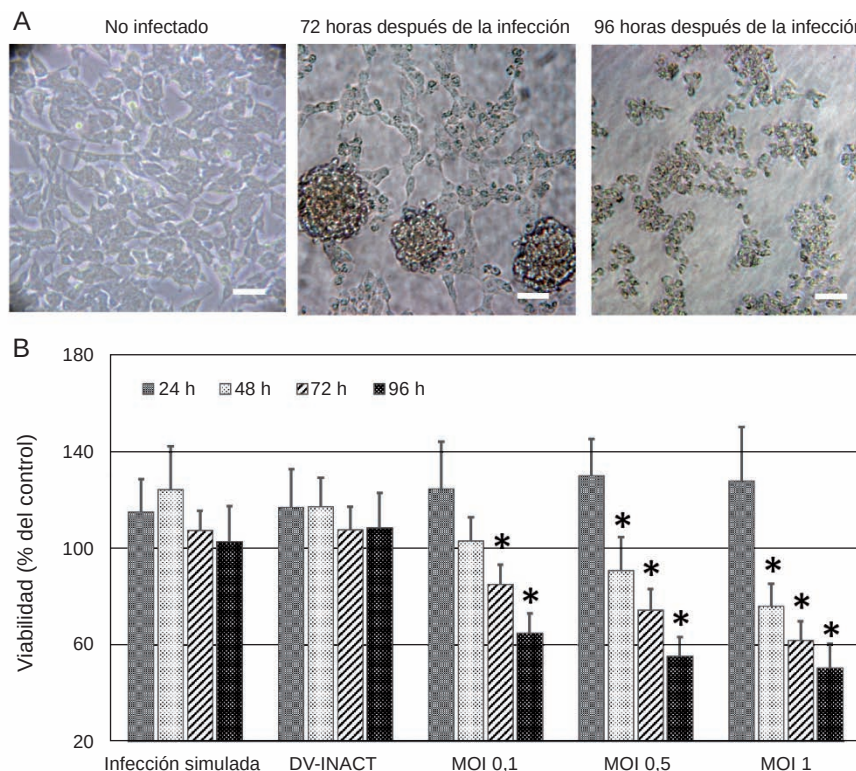


Figura 3. Efecto de la infección por el DENV-2 en la viabilidad celular

Aspecto en contraste de fase de las neuronas. **A.** Apariencia normal de los cultivos no infectados sembrados con una baja densidad. Aspecto de los cambios en las células después de tres días de infección; se observan agrupaciones celulares. En el cultivo infectado durante cuatro días con una MOI de 1 se observó la reducción en el tamaño de las células y la evidente reducción del número de neuronas. **B.** Cuantificación de la viabilidad de las neuronas SH-SY5Y en diferentes momentos después de la infección usando la prueba de MTT. La pérdida de viabilidad dependió del tiempo transcurrido después de la infección y del inóculo usado (MOI) ($n=5$). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control 'DV-inactivado' para cada momento (ANOVA y test *post hoc* de Scheffe).

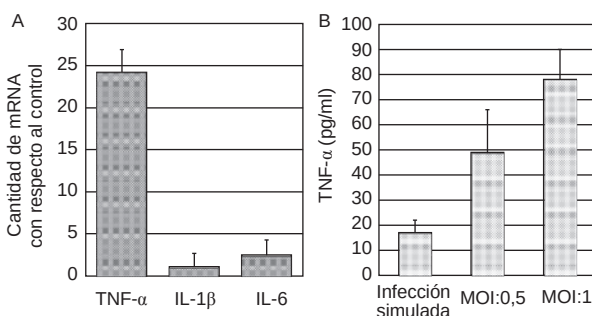


Figura 4. Cambios en la expresión del TNF- α en cultivos infectados. **A.** Cuantificación mediante PCR en tiempo real de los mensajeros de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en SH-SY5Y a las 48 horas de infección comparados con las células inoculadas en la infección simulada. **B.** Cuantificación del TNF- α en sobrenadantes de células SH-SY5Y ($n=3$)

respectivamente (figura 5B). Aunque usualmente un resultado positivo al aplicar el método TUNEL se considera como prueba de un proceso apoptótico, estrictamente hablando la fragmentación del ADN puede encontrarse tanto en la apoptosis como en

la necrosis, por lo cual, al evaluar el ADN purificado en estas células, se observó el distintivo patrón en escalera que caracteriza los procesos apoptóticos (figura 5C). Por el contrario, el ADN proveniente de células sin infectar permaneció intacto.

Por otro lado, para confirmar el proceso apoptótico en las células infectadas, se evaluó la translocación de la fosfatidilserina hacia la superficie externa como signo de apoptosis temprana. Las células SH-SY5Y se inocularon y, al cabo de tres horas de infección, fueron desprendidas y marcadas con anexina V, FITC y yoduro de propidio. Se detectó un aumento del número de células positivas con respecto a los cultivos sin infectar superior a 13 % en las infecciones con una MOI de 1 (figura 5D). El porcentaje de células positivas con el yoduro de propidio fue de 2,4 %, lo cual indica que en las etapas tempranas de la infección hay preponderancia del proceso apoptótico frente al necrótico. En su conjunto, estos experimentos

demonstraron que al menos parte del proceso de muerte celular inducido por el DENV-2 corresponde a un proceso apoptótico.

El TNF- α indujo un proceso de muerte apoptótica en las células SH-SY5Y.

Para evaluar el efecto del TNF- α en la viabilidad celular, las células SH-SY5Y se cultivaron y se estimularon con 200 ng/ml de esta citocina. Las células expuestas al TNF- α presentaron cambios morfológicos muy discretos a las 48 horas, pero claramente observables a las 72 horas de tratamiento, los cuales consistieron en aumento del número de células desprendidas, disminución del volumen celular, disminución de la densidad celular, aparición de una apariencia más redondeada y pérdida de la morfología poligonal, así como disminución del número y la longitud de las neuritas; además, algunas células también presentaron una morfología anormal con bordes irregulares.

Estos hallazgos indican muerte celular producida por apoptosis. Se encontró que, aproximadamente, 10 % de las células eran positivas con el método

de anexina V después de 24 horas de tratamiento con el TNF- α en dosis de 50 y 200 ng/ml, y no se registraron cambios en los porcentajes de marcación con yoduro de propidio, lo cual indica que esta citocina indujo el proceso de muerte celular apoptótico en las células SH-SY5Y.

El TNF-alfa incrementó la mortalidad celular inducida por el DENV-2.

Los resultados presentados hasta este punto evidencian, en primer lugar, una regulación positiva en la expresión del TNF- α durante la infección por el DENV-2, además, un proceso de muerte en las células SH-SY5Y desencadenado por esta citocina, así como un proceso de muerte celular durante la infección por el DENV-2, eventos estos que podrían estar correlacionados. Para investigar la posible relación entre estos factores, se agregó la proteína TNF- α recombinante humana a cultivos de células SH-SY5Y infectadas con el DENV-2 y, paralelamente, se neutralizó su acción mediante un anticuerpo anti-TNF- α . Se consideró que había muerte celular en las neuronas que fueron positivas

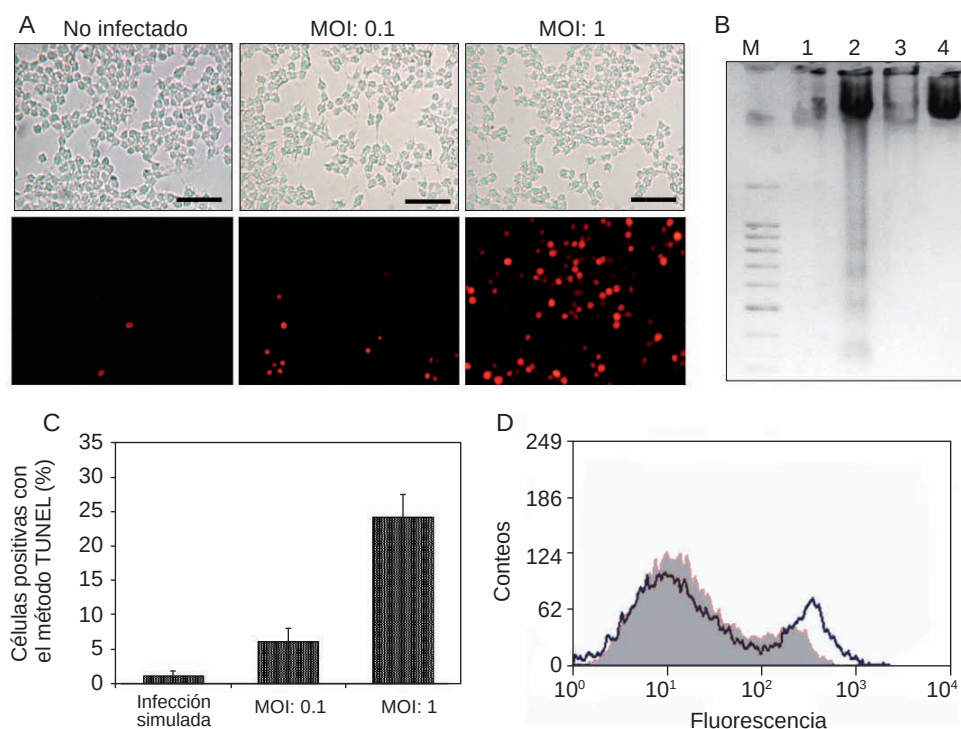


Figura 5. Inducción de apoptosis en neuronas SH-SY5Y infectadas con el DENV-2. **A.** Las células fueron infectadas con una MOI de 1 o 0,1 y 48 horas después se realizó la prueba TUNEL. Se muestran fotomicrografías representativas para cada condición; las células con fragmentación del ADN se observan con su núcleo rojo. Barra=60 μ m. **B.** Electroforesis del ADN de células infectadas con una MOI de 1 a las 24 horas (carril 1), con una MOI de 1 a las 48 horas (carril 2), con una MOI de 0,1 a las 24 horas (carril 3) y de neuronas no infectadas. **C.** Porcentaje de células positivas con el método TUNEL en cada condición. **D.** Neuronas SH-SY5Y infectadas con una MOI de 1 y marcaje con anexina V-FITC tres horas después; las muestras se analizaron en el citómetro. Se indica el porcentaje de células positivas en el cultivo infectado (línea negra) con respecto al control sin infección (área gris).

con el método de anexina-V, con yoduro de propidio o con ambos. Cuando se trataron las células con el TNF- α y simultáneamente se infectaron con el DENV-2, se observó que, a partir de las 24 horas, había una disminución de la viabilidad celular mayor que la producida con cualquiera de los dos factores por separado.

Resulta interesante que el tratamiento con el TNF- α y la infección con una MOI de 0,1 produjera una sinergia resultante en un aumento de la mortalidad superior, incluso, al producido por la infección con un inóculo 10 veces mayor (figura 6). El porcentaje de células muertas con respecto al control a las 24 horas de la infección aumentó casi dos veces con una MOI de 1 y disminuyó levemente después de la adición de un anticuerpo anti-TNF- α . La adición del TNF- α a los cultivos infectados con el DENV-2 incrementó significativamente la muerte celular, sin embargo, su neutralización evitó por completo el efecto sinérgico observado durante la infección con el DENV-2 y el tratamiento simultáneo con TNF- α . Esto sugiere que durante la infección de las células neuronales el TNF- α podría ser parte del proceso de muerte celular inducido por el DENV-2.

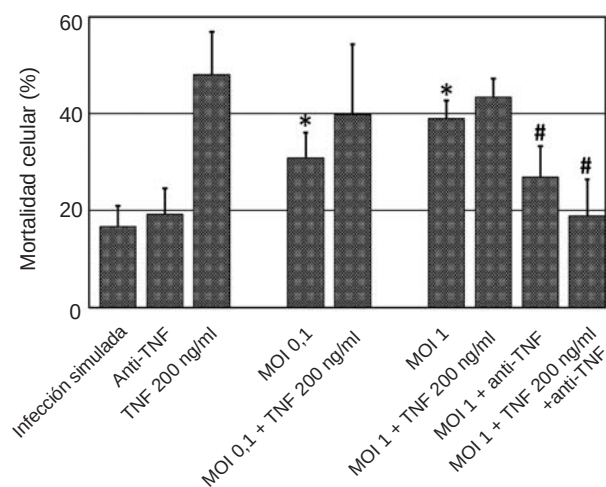


Figura 6. Efecto de la infección y el TNF- α sobre la viabilidad de células SH-SY5Y infectadas con el DENV-2. Las células se infectaron o trataron con 200 ng/ml de TNF- α humano recombinante o con el anti-TNF- α . Después de 24 horas se hizo una doble tinción con anexina V- FITC y yoduro de propidio y las muestras se analizaron en un citómetro de flujo. Se muestra el porcentaje de mortalidad después de hacer la sustracción del valor en el control. Se observó un efecto sinérgico de la muerte neuronal por acción del virus y el TNF- α . Los asteriscos indican un aumento significativo en la proporción de muerte celular. Los símbolos # indican una disminución significativa en la proporción de muerte celular con respecto a la condición de infección con una MOI de 1. Prueba de ANOVA y test *post hoc* de Scheffe ($p < 0,05$).

Discusión

Aunque el DENV no es un virus neurotrópico, hoy se considera la encefalitis por dengue como una verdadera entidad clínica y en algunas zonas endémicas los signos neurológicos pueden, incluso, llegar a ser la manifestación más frecuente del dengue grave (27,28). Durante mucho tiempo se consideró que las anormalidades neurológicas durante la infección por el DENV eran secundarias al daño hepático (encefalopatía), pero, desde los años 90 se ha acumulado evidencia sobre la presencia del virus o de anticuerpos específicos en el encéfalo y hasta el momento se han reportado más de 200 trabajos, principalmente series de casos, sobre las complicaciones neurológicas, sensoriales, neuromusculares y neurooftalmológicas en el curso del dengue (5). El aumento de la frecuencia de estos reportes sugiere, en primera instancia, que se han producido cambios en el perfil de la enfermedad debidos, probablemente, a variaciones en el tropismo del virus que promueven su interacción con diferentes tipos de moléculas y células receptoras. Ello resalta la necesidad de conocer más sobre el virus y sobre los posibles mecanismos a los que recurre para infectar diferentes tipos de células y tejidos (29,30).

Es poco lo que se sabe sobre el neurotropismo y la neuroinfección por el DENV, lo cual se debe, en parte, a que no hay un modelo animal que reproduzca los signos y síntomas característicos de la enfermedad, con lo cual se podrían conocer los posibles mecanismos asociados a la neuropatología (31). Para infectar ratones se requiere de la modificación de factores virales, del huésped o de ambos. Cuando esto se ha logrado, se ha detectado que las neuronas son el principal sitio de replicación viral en el sistema nervioso (30,32).

La investigación sobre los modelos *in vitro* continúa siendo de gran importancia y buena parte de la información obtenida sobre el dengue proviene de ellos. En el presente trabajo se demostró la sensibilidad y la permisividad de la línea neuronal humana SH-SY5Y a un DENV-2 aislado de muestras de pacientes, lo cual evidenció la transcripción del genoma y la traducción de las proteínas virales. Mediante un ensayo de formación indirecta de placas se confirmó, además, que las neuronas producen y liberan tempranamente viriones infecciosos; esta metodología no se había usado previamente y permitió, asimismo, evidenciar que la sensibilidad y la productividad de las células de neuroblastoma son similares a las de las células LLC-MK2, una de las líneas más sensibles al DENV (33).

En la mayoría de estudios con pacientes, las manifestaciones neurológicas se han observado más frecuentemente en aquellos infectados con el DENV-2 (8), un hallazgo que coincide con lo reportado por Araujo, *et al.* (11), y Solomon, *et al.* (12), en el sentido de que este serotipo posee características intrínsecas que propician su efecto en el sistema nervioso. En el presente trabajo, la infección con el DENV-2 causó un evidente efecto citopático en los cultivos de neuroblastoma, así como pérdida de viabilidad, la cual fue más evidente cuando se usó una mayor multiplicidad de infección. La evaluación morfológica y las pruebas TUNEL evidenciaron el proceso de muerte celular por apoptosis desde una fase muy temprana de la infección, lo cual se corroboró con el patrón de degradación del ADN y la marcación con anexina V, en concordancia con lo reportado en modelos de ratón con neuroinfección por dengue (13) y en otras líneas neuronales (34-38). Aunque anteriormente Lee, *et al.* (39) reportaron que en células de neuroblastoma de ratón la infección con el DENV activaba un mecanismo anti-apoptótico dependiente de la vía PI3K/Akt, al parecer esto no sucede en las células SH-SY5Y. Las células HUVEC, que se infectan en más de 90 % (como ocurrió en este caso), inducen la apoptosis solo en cerca de 20 % de las células, al parecer como un mecanismo de potenciación de la replicación viral (40).

La infección con el DENV-2 indujo una regulación excesiva de los mensajeros de TNF- α , lo cual coincide con lo reportado previamente en cerebros de ratón (14), aunque la transcripción de otras citocinas inflamatorias, como IL-1 β e IL-6, no aumentó. Es posible que estas dos últimas se produzcan en el cerebro por la acción de células diferentes a las neuronas. Se sabe muy bien que el TNF- α es el principal mediador inflamatorio durante la infección por el DENV (41,42) y que su concentración en el cerebro puede ser la suma del que producen las neuronas, más que resultado de su difusión desde la circulación sistémica hacia el parénquima cerebral.

Se ha demostrado que el TNF- α desempeña un papel dual y ambiguo de protección o daño neuronal dependiendo del contexto (43). El TNF- α exógeno indujo un aumento de la mortalidad de las células SH-SY5Y en un proceso definitivamente apoptótico (células positivas para anexina V), similar a lo reportado previamente (26,44). La inducción de la apoptosis dependiente del TNF- α suele asociarse a la unión de este ligando con el

receptor TNFR 1 y a la consecuente activación de la vía extrínseca que involucra a la caspasa 8. Sin embargo, como parte de los mecanismos tumorales de evasión de la muerte celular, las células SH-SY5Y no expresan la caspasa 8, inactivación que se debe a un mecanismo epigenético dependiente de la metilación del promotor del gen (45,46). Como alternativa de activación de la vía extrínseca está la caspasa 10, cuya expresión normal se ha reportado en estas células (45) y merece evaluarse en el contexto de la infección por el DENV.

La adición del TNF- α en las células infectadas aumentó la mortalidad celular, actuando sinérgicamente con la infección por el DENV, en tanto que el uso de un anticuerpo anti-TNF- α disminuyó levemente la mortalidad causada por la infección, aunque sí abolió por completo el efecto sinérgico deletéreo de la infección bajo el estímulo del TNF- α . La proporción de la mortalidad en las neuronas infectadas no cambió con el empleo del anti-TNF- α . Esto sugiere que la participación del TNF- α autocrino en la mortalidad celular observada sería solo parcialmente responsable de la apoptosis, lo cual indicaría la participación de otros mecanismos inductores de muerte presentes durante la infección *in vitro*. En este sentido, se han reportado nueve aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína M del DENV como necesarios y suficientes para la inducción de apoptosis en células de neuroblastoma en el ratón por la acción de un mecanismo dependiente de la vía mitocondrial (34). La ausencia de la caspasa 8 en el modelo indica una tendencia hacia un débil efecto apoptótico dependiente del TNF- α endógeno producido por los cultivos infectados, y hacia una mayor relevancia de otros mecanismos inductores de muerte que deben ser investigados.

Asimismo, se ha sugerido que, aunque la infección por dengue induce apoptosis en varios tipos celulares, también activa vías bioquímicamente diferentes de una manera específica para cada célula. Esta apreciación se fundamenta en que la expresión ectópica exacerbada del Bcl-2 retrasó el proceso apoptótico inducido por el DENV-2 en fibroblastos BHK-21, pero no en células de neuroblastoma de ratón N18. A su vez, a pesar de sus propiedades inductoras de apoptosis, la expresión de Bcl-Xs no produjo este efecto en las células BHK-21, aunque sí en las N18 (38). En este mismo sentido, Jan, *et al.* (36), reportaron que, en las células SK-N-SH, la infección con el DENV-2 activó vías relacionadas con la apoptosis, algunas de ellas no muy bien caracterizadas, y propusieron

un modelo secuencial que involucra a la fosfolipasa A2, el ácido araquidónico, el anión superóxido y el complejo proteico NF- κ B.

Más allá de la participación directa del virus en el proceso apoptótico neuronal, es posible que citocinas locales o sistémicas estén involucradas. Por ejemplo, se conoce que la infección cerebral con el DENV-2 en ratones indujo un incremento de mensajeros de TNF- α , y de IL1, IL6, IL1- β , entre otras (14). No hay información sobre estos aspectos en células humanas o sobre la probable participación de estas citocinas, en particular el TNF- α , en la muerte neuronal por dengue.

En su conjunto, los resultados del presente estudio sugieren que el TNF- α puede ser parte del proceso que induce daño y muerte celular durante una neuroinfección por dengue, aunque deberá evaluarse el efecto que pueda tener el TNF- α producido por otras células cerebrales, así como el efecto en la función cerebral de sus altas concentraciones en el plasma durante la infección aguda.

Aunque la proporción de casos con signos neurológicos durante la infección por el DENV es relativamente baja, se diagnostica cada vez con mayor frecuencia y abre un campo de investigación en torno a los cambios genéticos de los virus circulantes y a las características inmunitarias o genéticas de los huéspedes que podrían ser las responsables del daño nervioso que se presenta en esas ocasiones. En este estudio, se estableció que la muerte neuronal por apoptosis podría ser el mecanismo por el cual algunos aislamientos del DENV pueden tener un comportamiento virulento e invasivo en el sistema nervioso.

Conflicto de intereses

Los autores no tienen ningún conflicto de intereses con respecto a los productos o protocolos mencionados en este manuscrito.

Financiación

Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad El Bosque y por Colciencias (proyecto 1308-489-25267).

Referencias

1. Velandia ML, Castellanos JE. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*. 2011;15:33-43. [http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70074-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70074-1)
2. Póvoa TF, Alves AM, Oliveira CA, Nuovo GJ, Chagas VL, Paes MV. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: Histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One*. 2014;9:e83386. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083386>
3. Villar L, Rojas D, Besada-Lombana S, Sarti E. Epidemiological trends of dengue disease in Colombia (2000-2011): A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0003499. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003499>
4. Organización Mundial de la Salud, Programa Especial para Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales. Dengue. Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. La Paz: OPS/OMS; 2010.
5. Castellanos J, Bello J, Velandia-Romero M. Manifestaciones neurológicas durante la infección por el virus del dengue. *Infectio*. 2014;18:167-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.02.006>
6. Nimmagadda SS, Mahabala C, Bloor A, Raghuram PM, Nayak UA. Atypical manifestations of dengue fever (DF) - Where do we stand today? *J Clin Diagn Res*. 2014;8:71-3. <http://dx.doi.org/10.7860/JCDR/2014/6885.3960>
7. Méndez A, González G. Manifestaciones clínicas inusuales del dengue hemorrágico en niños. *Biomédica*. 2006;26:61-70. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1395>
8. Neeraja M, lakshmi V, Teja VD, Lavanya V, Priyanka EN, Subhada K, et al. Unusual and rare manifestations of dengue during a dengue outbreak in a tertiary care hospital in South India. *Arch Virol*. 2014;159:1567-73. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-014-2010-x>
9. Jackson S, Hann-Chu J, Chia P, Morgan O, Ng L. Dengue encephalitis. En: Ruzek D, editor. *Flavivirus encephalitis*. Croatia: InTech; 2011. p. 71-88.
10. Tan LV, Thai LH, Phu NH, Nghia HD, Chuong LV, Sinh DX, et al. Viral etiology of central nervous system infections in adults admitted to a tertiary referral hospital in Southern Vietnam over 12 years. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e3127. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003127>
11. Araújo F, Nogueira R, Araujo MS, Perdigão A, Cavalcante L, Brilhante R, et al. Dengue in patients with central nervous system manifestations, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:677-9. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1804.111552>
12. Solomon T, Dung NM, Vaughn DW, Kneen R, Thao LT, Raengsakulrach B, et al. Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet*. 2000;355:1053-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02036-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02036-5)
13. Desprès P, Frenkiel M, Ceccaldi P, Dos Santos CD, Deubel V. Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. *J Virol*. 1998;72:823-9.
14. Sánchez-Burgos G, Hernández-Pando R, Campbell IL, Ramos-Castañeda J, Ramos C. Cytokine production in brain of mice experimentally infected with dengue virus. *Neuroreport*. 2004;15:37-42.
15. García-Rivera EJ, Rigau-Pérez JG. Encephalitis and dengue. *Lancet*. 2002;360:261. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09481-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09481-3)
16. Rincón V, Alvear D, Solano O, Prada-Arismendy J, Castellanos JE. La infección por virus dengue induce la disminución de marcadores de diferenciación en células de neuroblastoma. *latreia*. 2011;24:126-35.
17. Padilla J, Rojas D, Sáenz-Gómez R. Dengue en Colombia. Epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Bogotá, D.C.: Guías de Impresión Ltda; 2012. p. 249.

18. **Ramos-Castañeda J, Imbert JL, Barron BL, Ramos C. A** 65-kDa trypsin-sensible membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastoma cells. *J Neurovirol.* 1997;3:435-40.
19. **Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM.** Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol.* 2005;79:4557-67. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.8.4557-4567.2005>
20. **Huelseweh B, Ehricht R, Marschall HJ.** A simple and rapid protein array based method for the simultaneous detection of biowarfare agents. *Proteomics.* 2006;6:2972-81. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200500721>
21. **Velandia-Romero ML, Acosta-Losada O, Castellanos JE.** *In vivo* infection by a neuroinvasive neurovirulent dengue virus. *J Neurovirol.* 2012;18:374-87. <http://dx.doi.org/10.1007/s13365-012-0117>
22. **Chingsuwanrote P, Suksanpaisan L, Smith DR.** Adaptation of the plaque assay methodology for dengue virus infected HepG2 cells. *J Virol Methods.* 2004;116:119-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.11.002>
23. **Prada-Arismendy J, Castellanos JE.** Real time PCR. Application in dengue studies. *Colomb Med.* 2011;42:243-58.
24. **Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV.** Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30:545-51.
25. **Zhivotovsky B, Orrenius S.** Assessment of apoptosis and necrosis by DNA fragmentation and morphological criteria. *Curr Protoc Cell Biol.* 2001;18. <http://dx.doi.org/10.1002/0471143030.cb1803s12>
26. **Kweon SM, Lee ZW, Yi SJ, Kim YM, Han JA, Paik SG, et al.** Protective role of tissue transglutaminase in the cell death induced by TNF- α in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biochem Mol Biol.* 2004;37:185-91.
27. **Solbrig M, Perng G.** Current neurological observations and complications of dengue virus infection. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2015;15:29. <http://dx.doi.org/10.1007/s11910-015-0550-4>
28. **Carod-Artal FJ, Wichmann O, Farrar J, Gascón J.** Neurological complications of dengue virus infection. *Lancet Neurol.* 2013;12:906-19. [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70150-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70150-9)
29. **Domínguez R, Kuster G, Onuki-Castro F, Souza V, Levi J, Pannuti C.** Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *J Neurol Sci.* 2008;267:36-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2007.09.040>
30. **Velandia M, Castellanos JE.** Flavivirus neurotropism, neuroinvasion, neurovirulence and neurosusceptibility: Clues to understanding flavivirus- and dengue-induced encephalitis. In: García ML, Romanowski V, editors. *Viral genomes - molecular structure, diversity, gene expression mechanisms and host-virus interactions.* Croacia: InTech; 2012. p. 219-40. <http://dx.doi.org/10.5772/26571>
31. **Charlier N, Leyssen P, De Clercq E, Neyts J.** Rodent models for the study of therapy against flavivirus infections. *Antiviral Res.* 2004;63:67-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.06.007>
32. **Imbert J, Guevara P, Ramos-Castañeda J, Ramos C, Sotelo J.** Dengue virus infects mouse cultured neurons but not astrocytes. *J Med Virol.* 1994;42:228-33.
33. **Guzmán MG, Kouri G.** Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996;3:621-7.
34. **Catteau A, Kalinina O, Wagner MC, Deubel V, Courageot MP, Després P.** Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *J Gen Virol.* 2003;84:2781-93. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.19163-0>
35. **Després P, Flamand M, Ceccaldi PE, Deubel V.** Human isolates of dengue type 1 virus induce apoptosis in mouse neuroblastoma cells. *J Virol.* 1996;70:4090-6.
36. **Jan JT, Chen BH, Ma SH, Liu CI, Tsai HP, Wu HC, et al.** Potential dengue virus-triggered apoptotic pathway in human neuroblastoma cells: Arachidonic acid, superoxide anion, and NF-kappaB are sequentially involved. *J Virol.* 2000;74:8680-91. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.74.18.8680-8691.2000>
37. **Marianneau P, Flamand M, Deubel V, Despres P.** Apoptotic cell death in response to dengue virus infection: The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever revisited. *Clin Diagn Virol.* 1998;10:113-9.
38. **Su HL, Lin YL, Yu HP, Tsao CH, Chen LK, Liu YT, et al.** The effect of human *bcl-2* and *bcl-X* genes on dengue virus-induced apoptosis in cultured cells. *Virology.* 2001;282:141-53. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2000.0820>
39. **Lee CJ, Liao CL, Lin YL.** Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection. *J Virol.* 2005;79:8388-99. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.13.8388-8399.2005>
40. **Long X, Li Y, Qi Y, Xu J, Wang Z, Zhang X, et al.** XAF1 contributes to dengue virus-induced apoptosis in vascular endothelial cells. *FASEB J.* 2013;27:1062-73. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.12-213967>
41. **Chaturvedi UC.** Tumour necrosis factor and dengue. *Indian J Med Res.* 2006;123:11-4.
42. **Houghton N, Martín K, Giaya K, Rodríguez J, Bosch I, Castellanos JE.** Comparación de los perfiles de transcripción de pacientes con fiebre de dengue y fiebre hemorrágica por dengue que muestra diferencias en la respuesta inmunitaria y claves en la inmunopatogénesis. *Biomédica.* 2010;30:587-97. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v30i4.297>
43. **Sriram K, O'Callaghan JP.** Divergent roles for tumor necrosis factor- α in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2007;2:140-53. <http://dx.doi.org/10.1007/s11481-007-9070-6>
44. **Deng M, Zhao JY, Ju XD, Tu PF, Jiang Y, Li ZB.** Protective effect of tubuloside B on TNF α -induced apoptosis in neuronal cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25:1276-84.
45. **Hopkins-Donaldson S, Bodmer JL, Boursoud KB, Brognara CB, Tschopp J, Gross N.** Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2000;60:4315-9.
46. **Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ, Wiewrodt BR, Ho R, Ikegaki N, et al.** Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res.* 2001;61:1314-9.

ARTÍCULO ORIGINAL

Presencia de virus entéricos en muestras de agua para el consumo humano en Colombia: desafíos de los sistemas de abastecimiento

Dioselina Peláez¹, Blanca Lisseth Guzmán², Johanna Rodríguez¹,
Felipe Acero¹, Gerardo Nava²

¹ Laboratorio de Virus Entéricos, Grupo de Virología, Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de Salud Ambiental, Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El agua de consumo humano puede ser vehículo de transmisión de agentes patógenos. La detección de virus entéricos en estas muestras de agua es esencial para establecer las acciones adecuadas de control y prevención de las enfermedades asociadas.

Objetivo. Analizar los resultados del diagnóstico de virus entéricos en muestras de agua para el consumo humano recibidas en el Instituto Nacional de Salud y establecer su asociación con los datos sobre la calidad del agua en los municipios de Colombia.

Materiales y métodos. Se hizo un análisis descriptivo retrospectivo de los resultados obtenidos en la detección de rotavirus, enterovirus, virus de la hepatitis A y adenovirus, en muestras de agua recibidas para estudios complementarios en la investigación de brotes de hepatitis entérica, de enfermedad diarreica aguda y de enfermedades transmitidas por alimentos. Dicha información se correlacionó con los datos de la vigilancia de la calidad del agua municipal determinada según el índice de riesgo de la calidad del agua (IRCA).

Resultados. Se procesaron 288 muestras de 102 municipios de Colombia, de las cuales el 50,7 % fue positivo para algún virus: 26,73 %, para el virus de la hepatitis A; 20,48 %, para enterovirus y rotavirus, y 18,05 % para adenovirus. Se detectaron virus en 48,26 % de las muestras de agua no tratada y en 45,83 % de las de agua tratada. El IRCA no mostró correlación con la presencia de virus.

Conclusiones. La presencia de virus en el agua representa un riesgo para la salud pública. La prevención de la transmisión de virus por medio del agua requiere políticas para fortalecer los sistemas de suministro y para mejorar la vigilancia epidemiológica.

Palabras clave: enterovirus, rotavirus, hepatitis A, contaminación del agua, abastecimiento de agua.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2987>

Presence of enteric viruses in water samples for consumption in Colombia: Challenges for supply systems

Introduction: Since drinking water can be a vehicle for the transmission of pathogens, the detection of enteric viruses in these water samples is essential to establish the appropriate measures to control and prevent associated diseases.

Objective: To analyze the results obtained for enteric viruses in water samples for human consumption received at the Colombian *Instituto Nacional de Salud* and establish their association with the data on water quality in Colombian municipalities.

Materials and methods: We conducted a descriptive-retrospective analysis of the results obtained in the detection of rotavirus, enterovirus, hepatitis A virus and adenovirus in water samples received for complementary studies of enteric hepatitis, acute diarrheal disease and foodborne diseases. Data were correlated with the results of water quality surveillance determined by the national human consumption water quality index (IRCA).

Results: Of the 288 samples processed from 102 Colombian municipalities, 50.7% were positive for viruses: 26.73% for hepatitis A virus, 20.48% for enterovirus and rotavirus and 18.05% for adenovirus.

Contribución de los autores:

Dioselina Peláez: diseño del estudio, análisis e interpretación de los datos, redacción del manuscrito

Johanna Rodríguez y Felipe Acero: ensayos de concentración viral y detección molecular

Blanca Lisseth Guzmán: análisis e interpretación de los datos, redacción del manuscrito

Gerardo Nava: análisis e interpretación de los datos

Viruses were detected in 48.26% of non-treated water samples and in 45.83% of treated water samples. The IRCA index showed no correlation with the presence of viruses.

Conclusions: The presence of viruses in water represents a public health risk and, therefore, the prevention of virus transmission through water requires appropriate policies to reinforce water supply systems and improve epidemiological surveillance.

Key words: Enterovirus, rotavirus, hepatitis A, water pollution, water supply.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2987>

El agua puede ser uno de los principales vehículos de transmisión masiva de agentes infecciosos, incluidos los virus. Se han identificado diferentes especies virales en el agua (1), de las cuales cerca de 100 pueden afectar a la población humana y a diferentes especies animales.

Los virus entéricos son un grupo de agentes que causan numerosas enfermedades en humanos, son transmitidos principalmente por la vía oral-fecal, y causan enfermedades como hepatitis, gastroenteritis, meningitis, encefalitis, afecciones respiratorias y cutáneas, diabetes y conjuntivitis, entre otras (1-3). Los virus entéricos incluyen especies de diferentes familias y los más representativos por su impacto en la salud humana son los enterovirus (polio, virus huérfano citopático entérico humano - ECHO, virus Cocksackie), los astrovirus, los adenovirus entéricos, los ortoreovirus, los calicivirus (norovirus y sapovirus) y los virus de la hepatitis A y E (3-5).

Estos virus están desprovistos de envoltura y presentan cápsides resistentes que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables y resistir a la acidez y la actividad proteolítica del estómago, así como infectar las células epiteliales vulnerables, replicándose eficientemente y excretándose en grandes cantidades en las heces (10^5 - 10^{11} partículas virales/g) (1,3). Los virus llegan al medio ambiente y, en especial, a los recursos hídricos a través de fugas en los sistemas de alcantarillado y pozos sépticos, en descargas de aguas residuales y en vertimientos urbanos y agrícolas, lo cual, como es de esperar, afecta a la población humana (1-2).

Diversas enfermedades infecciosas en el mundo son causadas por la contaminación del agua de consumo humano y la falta de saneamiento;

aproximadamente, 2,9 millones de personas mueren cada año por estas causas según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (6). La creciente necesidad de agua potable debida a la sobrepoblación humana, la incesante urbanización, el aumento de la contaminación de los mantos acuíferos y el cambio climático en las últimas décadas, han convertido en un imperativo la preservación de las condiciones que garanticen la calidad del agua de consumo humano (7).

La mayoría de los programas de vigilancia que analizan su calidad microbiológica en diferentes países, entre ellos Colombia, emplean principalmente indicadores bacterianos como la presencia de *Escherichia coli* y de coliformes totales, pues son microorganismos de fácil y rápida medición (8). Sin embargo, varios estudios han demostrado que dichos métodos son ineficaces para indicar la presencia de otros agentes, como protozoos y virus patógenos en el agua (9).

La evaluación de la calidad del agua para consumo humano en el país incluye un programa de vigilancia según lo establecido en la Resolución 2115 del 2007, la cual define la frecuencia y el número de muestras analizadas de acuerdo con la población abastecida. Esta resolución también contempla el índice de riesgo de la calidad del agua (IRCA) como instrumento de evaluación del grado de riesgo de la presencia de enfermedades relacionadas con el incumplimiento de las características físicas, químicas y microbiológicas de potabilidad (10). En el IRCA se consideran, entre otras, características básicas de color, pH, turbidez, cloro residual libre, coliformes totales y *E. coli* como los indicadores más representativos de la calidad microbiológica y fisicoquímica del agua, cuyo cumplimiento es requisito obligatorio para todos los municipios del país.

Diversos factores hacen que la presencia de virus en el agua tenga gran relevancia para la salud pública. Los virus entéricos pueden sobrevivir y mantener su capacidad infecciosa en el agua durante periodos prolongados, y se ha reportado su presencia hasta durante 120 días en agua dulce

Correspondencia:

Dioselina Peláez-Carvajal, Grupo de Virología, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 220 0770, extensión 1428
dpelaez@ins.gov.co

Recibido: 27/07/15; aceptado: 14/04/16

y 130 días en agua de mar, dependiendo de las condiciones ambientales a las que se sometían (1). En general, se considera que estos patógenos son de difícil inactivación mediante los sistemas de tratamiento de aguas residuales, ya que requieren mayor tiempo de contacto y mayor concentración del hipoclorito de sodio (cloro residual libre de los compuestos clorados que se usan en la desinfección del agua). Además, la dosis infecciosa es baja (varía entre 1×10^1 y 1×10^2) y, por lo tanto, la presencia de un número reducido de virus puede producir enfermedades en un individuo vulnerable (1,11-12). La carga de mortalidad y morbilidad que se le atribuye a los agentes virales se desconoce por la poca información disponible debido a las dificultades para la recuperación y la concentración de los virus, y a los altos costos de las metodologías empleadas para el diagnóstico (13).

En Colombia, se han realizado pocos estudios sobre la presencia de virus entéricos en aguas de consumo humano; en un estudio en el municipio de Facatativá, en el cual se analizaron 226 muestras de aguas crudas y tratadas recolectadas entre el 2000 y el 2005, se identificó una muestra positiva para astrovirus procedente del río que abastece el acueducto, dos muestras con presencia de norovirus en agua tratada y 13 muestras positivas para rotavirus tanto de agua cruda como tratada; los autores señalan la importancia del agua como un vehículo de transmisión de los virus entéricos (14). En el 2008, se analizaron 80 muestras procedentes del departamento del Chocó, 20 de las cuales correspondían a agua tratada del acueducto de Quibdó y, 60, a agua no tratada. Se identificaron seis muestras positivas para rotavirus y dos para el virus de la hepatitis A en agua tratada y no tratada (15).

Con base en la definición de 'evento de interés en salud pública' como aquella situación importante o trascendente para la salud pública colectiva según criterios de frecuencia, gravedad, comportamiento epidemiológico, posibilidades de prevención y costo-efectividad de las intervenciones, el Instituto Nacional de Salud ha considerado de interés la notificación obligatoria en el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) de las llamadas enfermedades transmitidas por el agua, las cuales pueden tener como agentes etiológicos bacterias, protozoos y virus; estos últimos son los causantes de la hepatitis A, la hepatitis E, la enfermedad diarreica aguda (EDA), las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) y la meningitis, entre otras infecciones.

En este sentido, frente a la necesidad de identificar los virus entéricos en el agua de consumo humano en Colombia, el Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud estandarizó un método de concentración y detección de virus en aguas de consumo mediante la técnica de filtración y ultrafiltración tangencial (F/UFT) como método de concentración (16), seguida de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y en tiempo real para la detección e identificación de cuatro virus entéricos.

El presente estudio tuvo como objetivo analizar los resultados de la detección e identificación de virus entéricos en el agua para el consumo humano relacionados con casos sospechosos de hepatitis entérica, EDA y ETA durante el periodo de 2008 a 2014 en Colombia, y establecer su asociación con la calidad del agua que se distribuye en algunos municipios.

Materiales y métodos

Se hizo un análisis descriptivo retrospectivo de los resultados del diagnóstico de virus entéricos (rotavirus, enterovirus, virus de la hepatitis A, adenovirus) en muestras de agua de consumo humano recibidas en el Instituto Nacional de Salud para someterlas a análisis complementarios de la investigación de brotes de hepatitis entérica, EDA y ETA notificados al Sistema Nacional de Vigilancia (Sivigila) durante el periodo de 2008 a 2014 en 102 municipios de Colombia. La detección de los virus se hizo en una concentración de 10 litros de agua (volumen mínimo) por filtración y ultrafiltración tangencial, según la metodología descrita por Peláez (16). Los rotavirus, enterovirus y el virus de la hepatitis A fueron detectados por PCR en tiempo real y los adenovirus por PCR convencional.

Las muestras de agua se recolectaron en ríos, lagos, pozos, aguas subterráneas, manantiales, tanques de almacenamiento o pilas de almacenamiento, así como en agua tratada con sospecha de estar contaminada con microorganismos infecciosos. En todos los casos el muestreo estuvo a cargo de los ingenieros o técnicos de saneamiento municipal, y el envío de las muestras al Instituto Nacional de Salud se hizo bajo condiciones de refrigeración (4 a 8 °C) y sin exposición directa a la luz solar. Los resultados obtenidos se analizaron con métodos de estadística descriptiva.

Con el fin de conocer si la presencia de los virus se relacionaba con la calidad del agua distribuida en los municipios incluidos en el estudio, se

analizó la asociación entre la presencia de virus y los datos sobre la calidad del agua registrados en el Subsistema de Información para la Vigilancia del Agua para Consumo Humano (Sivicap), determinada por el IRCA, información que es recopilada por las autoridades de salud en cada municipio.

Para el análisis de la asociación se consultaron los valores del IRCA mensual correspondientes a cada municipio donde se capturaron las muestras para el análisis viral. Dichos valores se analizaron considerando los cinco niveles de riesgo establecidos (sin riesgo, riesgo bajo, riesgo medio, riesgo alto e inviabilidad sanitariamente) estipulados en la Resolución 2115 de 2007 (10). El análisis de correlación entre los resultados de virología y los niveles de la calidad del agua según el IRCA, se hizo utilizando tablas de contingencia y calculando el valor de ji al cuadrado para un nivel de confianza de 95 %. El análisis se hizo con el programa SPSS®, versión 18 (PASW Statistics).

Resultados

Durante el período de 2010 a 2014 se procesaron 288 muestras provenientes de 102 municipios de 24 departamentos, y de Bogotá; los departamentos con mayor número de muestras estudiadas fueron Casanare (15,28 %), Cesar (8,68 %), Cundinamarca (8,68 %) y Sucre (7,29 %) (figura 1). En el análisis de la distribución de las muestras según el sitio y punto de toma, se encontró que 27,43 % de las muestras provenía de viviendas (casas o puntos domiciliarios); 20,83 %, de instituciones educativas (colegios, escuelas o jardines infantiles); 8,33 %, de tanques de almacenamiento de agua, y 9,03 %, de los acueductos (figura 2).

De las 288 muestras procesadas, 50,7 % (146) fue positivo para alguno de los virus entéricos buscados. El año con mayor positividad viral fue el 2011, con 68,3 %, seguido del 2014, con 65,3 %, aunque en este último año se redujo notablemente el número de muestras estudiadas.

El virus de la hepatitis A fue el más frecuentemente detectado (26,73 %), seguido de los enterovirus y los rotavirus (20,48 %) y, por último, los adenovirus (18,05 %). En 39 muestras (26,7 %) se identificaron dos agentes virales diferentes, en 24 (16,46 %) se identificaron tres, y en cinco (3,42 %) se identificaron los cuatro agentes en estudio. El porcentaje de muestras positivas para los virus fue diferente en cada año: en 2008 y 2014, los más frecuentes fueron los adenovirus (31,25 % y 46,93 %, respectivamente), en 2011 y 2013,

el virus de la hepatitis A (36,5 % y 16,16 %, respectivamente), y en 2008, los enterovirus (36,14 %) (figura 3).

En cuanto a la fuente de procedencia del agua, se observó que 139 (48,26 %) muestras correspondían a aguas no tratadas y 132 (45,83 %) a fuentes de agua tratada; para 5,9 % de las muestras no se registró información sobre el origen de la fuente. Se observó un porcentaje elevado de muestras positivas a los virus tanto en aguas tratadas como en aguas no tratadas, con 52,27 y 48,92 %, respectivamente (cuadro 1). El análisis según el tipo de agua evidenció que los adenovirus fueron los más frecuentes en aguas tratadas (figura 4).

Los valores del IRCA correspondientes a las muestras procesadas se distribuyeron en los niveles de riesgo según su resultado positivo o

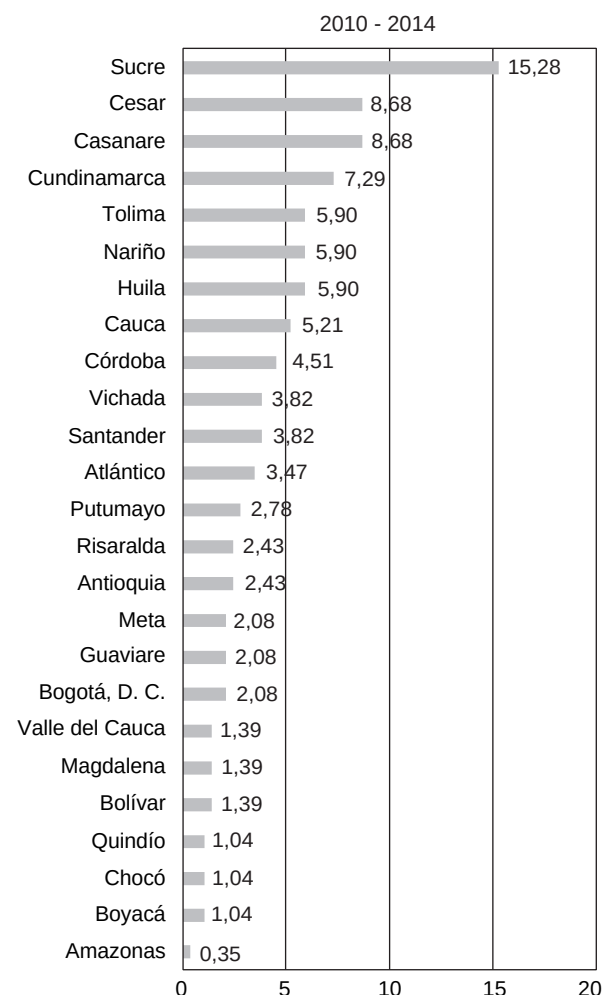


Figura 1. Distribución de las muestras reportadas según el ente territorial de procedencia, Colombia 2010-2014

Fuente: Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud

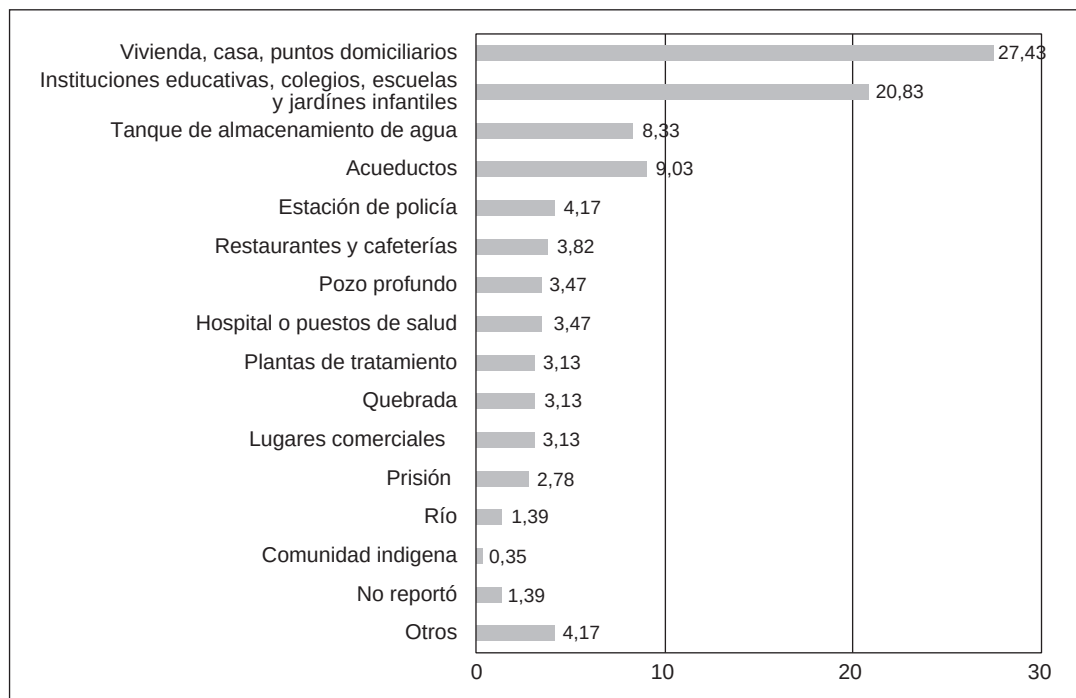


Figura 2. Distribución de las muestras reportadas según el punto de recolección, Colombia, 2010-2014

Fuente: Laboratorio de Virología del Instituto nacional de Salud

negativo para los virus (figura 5). Los resultados mostraron una distribución porcentual semejante de las muestras de aguas negativas y positivas para virus entéricos según los niveles de riesgo.

El análisis de asociación entre los resultados de virología y los datos de la calidad del agua para consumo humano según el IRCA, no fue estadísticamente significativo, con un ji al cuadrado de 7,232 ($p=0,300$).

Discusión

Este estudio estableció la presencia de virus entéricos en el agua de consumo humano mediante el análisis de muestras asociadas a casos o brotes de hepatitis entérica, EDA y ETA, en diferentes municipios de Colombia. Se registró un alto porcentaje de circulación de enterovirus, de virus de la hepatitis A, de rotavirus y adenovirus, y en algunas muestras se detectó más de un agente viral. Se encontraron virus entéricos en fuentes de agua tratada, lo cual evidencia su persistencia después de los procesos de tratamiento, así como su resistencia a los métodos físicos y químicos que normalmente inactivan otros agentes infecciosos como las bacterias, aunque los resultados también podrían ser indicativos de la poca rigurosidad con que se aplican los procedimientos de potabilización.

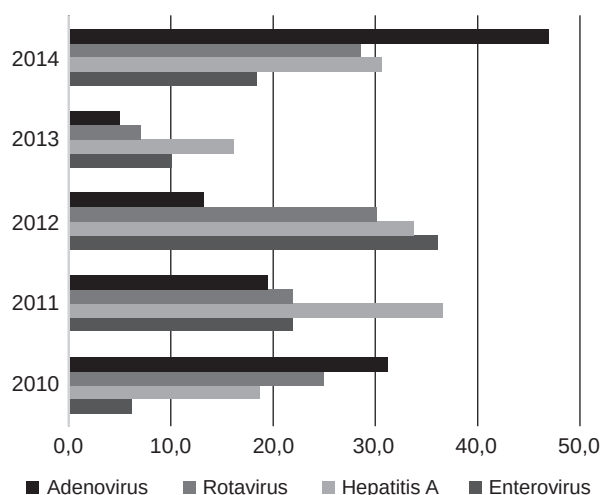


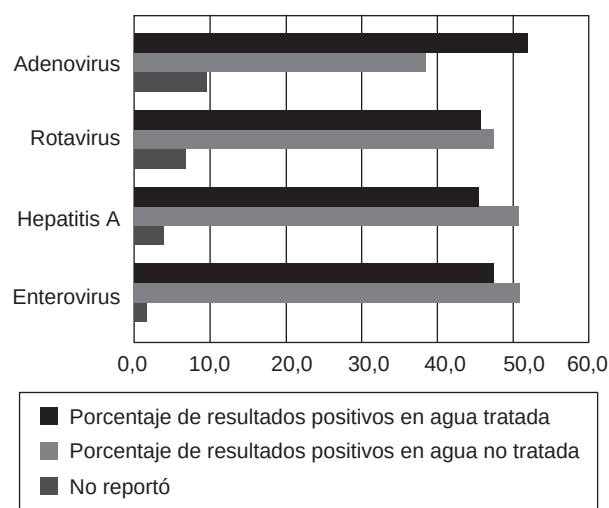
Figura 3. Porcentaje de muestras positivas por agente viral y año, 2010-2014

Fuente: Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud

Cabe resaltar que el número de muestras reportadas depende en gran medida de la sensibilidad del sistema de vigilancia para identificar las situaciones de salud asociadas con la calidad del agua, lo cual está directamente relacionado con la capacidad de las autoridades para desarrollar las investigaciones que confirmen la presencia de los virus en la población y en el agua de

Cuadro 1. Porcentaje de muestras virales positivas según la fuente de procedencia, Colombia, 2010-2014

Año	Agua tratada			Agua cruda			Sin información		
	Número de muestras	Positivas	%	Número de muestras	Positivas	%	Número de muestras	Positivas	%
2010							16	9	56,25
2011	12	8	66,6	29	20	68,97			
2012	29	19	65,52	54	31	57,41			
2013	57	17	29,82	41	10	24,39	1	0	0
2014	34	25	73,53	15	7	46,67			
Total	132	69	52,27	139	68	48,92	17	9	52,94

**Figura 4.** Porcentaje de muestras positivas por agente viral según el tipo de fuente (de agua tratada o no), 2010-2014
Fuente: Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud

consumo humano. Es probable, además, que no se detecten todas las situaciones relacionadas con virus transportados por el agua, por lo cual su verdadera incidencia estaría subestimada. Para obtener un mayor conocimiento del papel del agua como vehículo de enfermedades virales, es indispensable fortalecer la vigilancia epidemiológica en todo el país y desarrollar acciones que permitan confirmar su participación en la transmisión de enfermedades de origen hídrico.

Los cuatro virus identificados en este estudio causan enfermedades endémicas en Colombia; sin embargo, no se analizaron otros agentes virales y, por lo tanto, no se descarta que el abanico de agentes infecciosos sea aún más amplio y que el agua juegue un papel, incluso más decisivo, como vehículo de enfermedades en nuestro país. Los patógenos detectados tienen gran relevancia para la salud y su presencia en el agua podría aumentar su transmisión e incidencia y, aunque existen

estrategias para su prevención, la disminución de la circulación de estos virus debe ir acompañada de acciones que mejoren el saneamiento básico y el acceso al agua potable.

Para el virus de la hepatitis A se ha estimado una seroprevalencia de anticuerpos del tipo IgG de entre 26,3 y 40,4 % en el grupo de población de 10 a 15 años de edad en ciudades como Bogotá, Bucaramanga, Cali y Medellín (17). La EDA ocupa uno de los primeros lugares de morbilidad en menores de cinco años y el rotavirus que la causa se considera su agente etiológico más representativo en niños menores de cinco años en Colombia (18). En estudios realizados en el país entre 2000 y 2015, se reportó que los rotavirus causaron 50 % de las hospitalizaciones por diarreas en menores de 24 meses, lo cual evidencia su importancia para la salud infantil (19). Con base en la información de la vigilancia centinela, en 2009 se estableció que el rotavirus era el agente responsable de 23 % de las hospitalizaciones por diarreas en menores de cinco años; en 2010 se le detectó en 11,5 % de los casos y, en 2014, en 15,6 %; en general, la detección de los rotavirus viene disminuyendo de forma notable debido a la inclusión de la vacuna contra rotavirus en el esquema de inmunización de menores de seis meses a partir de 2009 en el país (20,21).

Los enterovirus no polio son responsables de un gran número de enfermedades muy frecuentes en niños y en recién nacidos que se presentan con una gran diversidad de cuadros clínicos. La forma más frecuente de presentación es la enfermedad febril inespecífica, que en los niños hace pensar generalmente en una sepsis bacteriana. Algunas otras manifestaciones clínicas muy frecuentes son: resfriado común, faringitis, herpangina, estomatitis, neumonía, pleurodinia, conjuntivitis aguda hemorrágica, miocarditis o pericarditis, exantema, meningitis aséptica, encefalitis y parálisis. En varios estudios

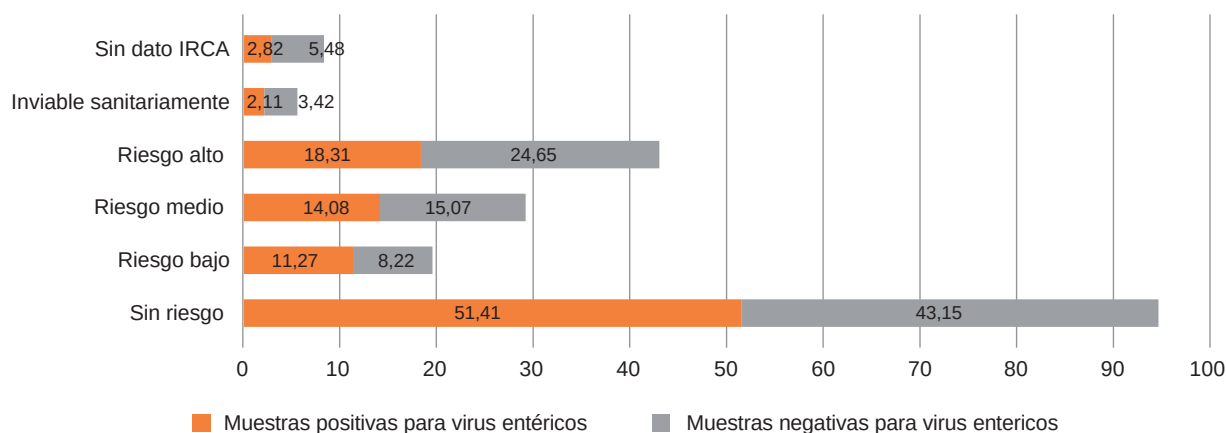


Figura 5. Distribución de las muestras virales positivas y negativas según porcentajes y niveles de riesgo del índice de riesgo de la calidad del agua (IRCA)

se ha demostrado que la circulación de enterovirus en menores de 10 años en Colombia se acerca a 13,3 % en muestras fecales (22). En cuanto al adenovirus entérico, son pocos los estudios en los que se ha registrado su prevalencia en Colombia; sin embargo, se le identificó en 5,66 % de las muestras para la vigilancia centinela de EDA en el 2015, con mayor presencia en algunas regiones, lo cual demuestra su importancia como agente etiológico de dicha condición (21).

El sistema de vigilancia en salud pública de Colombia establece el análisis de la calidad del agua en casos de brotes en los cuales se sospeche la transmisión de origen hídrico; durante la investigación de estos brotes, además de la identificación de virus en el agua, deben tenerse en cuenta los factores relacionados con el estado y el mantenimiento de las redes locales, las fallas en los procedimientos para tratar el agua, las condiciones en la red de distribución domiciliar y la frecuencia en la limpieza de los tanques de almacenamiento, ya que pueden alterar en gran medida la calidad del agua. Para completar el análisis, pueden considerarse también los datos de la vigilancia de la calidad del agua relativos al suministro del agua y su recorrido desde la cuenca abastecedora aferente hasta su entrega en la red de distribución.

Dado el impacto de la transmisión de virus por el agua, es necesario fortalecer la vigilancia de las enfermedades resultantes para conocer su incidencia y su tendencia, así como los agentes etiológicos involucrados, el tipo de fuente, las causas de la contaminación y los factores de riesgos, con el fin de orientar la adopción de medidas de

control y prevención apropiadas. La vigilancia de las enfermedades transmitidas por el agua es una estrategia difícil de desarrollar, sobre todo en países en desarrollo, donde los sistemas de vigilancia son deficientes. En el reporte de estas enfermedades en los Estados Unidos, se han observado dificultades en la investigación de los factores de riesgo ambientales asociados a los brotes y la identificación de los agentes etiológicos por laboratorio (23). En este sentido, la implementación de la vigilancia de las enfermedades relacionadas con el agua debe ir acompañada del fortalecimiento de las capacidades de vigilancia epidemiológica de los territorios, de la infraestructura de los laboratorios, del recurso humano adecuadamente capacitado, de los recursos financieros para el desarrollo de la investigación en campo, y de la colaboración entre las entidades del sector del agua.

El gran número de muestras de agua sin tratamiento con presencia de virus evidenció que hay poblaciones que consumen agua sin ningún tipo de tratamiento, lo que representa una mayor exposición a enfermedades virales. Según las estimaciones del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), en Colombia existe un alto porcentaje de cobertura de acueducto en los municipios, sin embargo, muchos de ellos no cuentan con sistemas de tratamiento para potabilizar el agua. En el 2004, 28 % de los municipios no contaba con agua potable por falta de eficiencia en la asignación y ejecución de los recursos (24). En muchos países en desarrollo no se prioriza la provisión de sistemas de abastecimiento debido a la falta de gobernanza en temas ambientales y de gestión pública (25-29). En este sentido, es necesario intensificar los esfuerzos para detectar y

eliminar las posibles vías de contaminación de las fuentes sin tratamiento, e implementar sistemas de tratamiento que garanticen la eliminación de estos virus del agua.

En este análisis se demostró la persistencia de los virus entéricos después del tratamiento del agua para consumo humano en algunos municipios de Colombia. En varios países se ha reportado la presencia de virus en aguas tratadas (14,15,30-32). Los datos de la vigilancia de la calidad del agua en Colombia evidencian que existe un alto porcentaje de fuentes de agua que no cumplen con el patrón de potabilidad según los indicadores bacteriológicos. Entre 2008 y 2012, de 28 a 23 % de las muestras remitidas para vigilancia no cumplió con los niveles de *E. coli* y, entre 40 y 33 %, con los de coliformes, lo cual hacía factible la presencia de virus entéricos (33). La presencia de virus en el agua tratada puede estar relacionada con los tratamientos inadecuados, la falta de continuidad en su aplicación, la edad del sistema de distribución y los problemas consecuentes en la red de distribución, el almacenamiento inadecuado, y los fenómenos climáticos extremos de invierno o verano que pueden dificultar las operaciones y que son tan comunes en países en desarrollo (29). En este sentido, los sistemas de tratamiento deben validarse para constatar su eficacia en la inactivación de los virus (8), con especial énfasis en el tiempo de contacto del desinfectante (hipoclorito de sodio) con el agua.

Los virus entéricos son generalmente más resistentes al cloro residual libre que las bacterias, y 99 % de los virus son inactivados en concentraciones de 2 a 30 mg/minuto de cloro desinfectante (32). Los virus que se encuentran dentro de partículas orgánicas pueden requerir una intensa desinfección con cloro, ya que dichas partículas les confieren protección (32). Para garantizar la inactivación de los virus deben establecerse condiciones óptimas para una desinfección eficiente, tales como valores de turbidez del agua menores o iguales a 1,0 (UNT) y un pH de entre 6,5 y 8,0, con el fin de mejorar la acción del cloro (8). En Colombia, los datos sobre la turbidez del agua para consumo humano han evidenciado un alto porcentaje de fuentes con valores por encima de dicho valor, lo cual puede afectar la inactivación de los virus y exige reforzar los procesos de desinfección (33). Para reducir la contaminación por virus entéricos, la OMS recomienda implementar el plan de seguridad del agua, fortalecer las medidas de control orientadas

a reducir el riesgo potencial derivado de los virus entéricos, prevenir la contaminación de las cuencas con residuos humanos, y aplicar los tratamientos y la desinfección adecuados (8).

Un aspecto importante en la prevención de las enfermedades virales transmitidas por agua es la mejoría de la calidad del agua de las cuencas, lo cual disminuye la contaminación de la fuente de agua, los procedimientos de tratamiento y los costos (34). Por lo tanto, deben instaurarse programas para la prevención de contaminantes en las cuencas y, así, preservar la calidad del agua de las fuentes abastecedoras. En algunas ciudades se ha invertido en programas de manejo de las cuencas en lugar de aumentar la sofisticación del tratamiento, con lo cual se han disminuido los costos de filtración, entre otros procedimientos (35). Aunque Colombia cuenta con un marco legal para los recursos hídricos, existe poca información sobre el estado de la calidad del agua de las cuencas, incluida la presencia de virus en ellas. La supervisión de los niveles de contaminación es esencial para establecer las acciones correctivas, por lo cual deben promoverse incentivos para la preservación y estrategias de educación ambiental, así como la implementación de sistemas de tratamiento de aguas residuales, especialmente en las grandes ciudades, para disminuir la circulación de los virus.

Colombia cuenta con la vigilancia rutinaria de las fuentes de agua para consumo humano mediante la metodología de múltiples barreras que busca minimizar el riesgo de contaminación del agua. Dicha metodología incluye la vigilancia de las fuentes de agua con base en indicadores microbiológicos y fisicoquímicos, la inspección de las prácticas sanitarias de los sistemas de abastecimiento y el mapa de riesgo del agua para consumo humano con énfasis en las cuencas, y el tratamiento previo y posterior. Sin embargo, este sistema no incluye la vigilancia de los virus en el agua para consumo humano en la red de distribución, debido a la complejidad de las pruebas de laboratorio necesarias y sus costos (36). Sin embargo, el análisis de los virus puede incluirse en los mapas de riesgo de la calidad del agua para consumo humano, con el fin de evaluar su impacto en la salud de la población. En el presente estudio, el análisis de la asociación entre la presencia de los virus y el índice de riesgo de la calidad del agua para consumo humano no fue estadísticamente significativo, lo cual indica que

el análisis de la calidad del agua no alcanza a reflejar la problemática presencia de los virus en las muestras; por ello, es necesario implementar un indicador que la refleje.

Los diagnósticos moleculares más utilizados por su sensibilidad y el tiempo que requieren son las técnicas de PCR convencional y de PCR en tiempo real. Sin embargo, presentan limitaciones, ya que no determinan si la partícula detectada es infecciosa o no (13). Para determinar el potencial infeccioso de los virus es necesario su aislamiento en cultivos celulares, pero se desconocen las condiciones en que muchos patógenos entéricos deben ser cultivados (37), en tanto que otros virus crecen lentamente o no producen un efecto citopático (38). Aunque se requieren estudios y estandarizaciones para establecer una mejor metodología de identificación de los virus, la sola presencia de material genético viral ya representa una amenaza para la salud pública (8).

Para elegir el indicador viral que refleje la presencia de los virus en el agua y la eficiencia de los procesos de tratamiento y desinfección para su inactivación, es esencial considerar que este debe encontrarse en concentraciones elevadas en las heces de personas y animales, deber ser fácilmente detectable mediante métodos diagnósticos, no crecer en el agua, estar presente en concentraciones mayores que las de los agentes patógenos fecales y responder a los procesos de tratamiento de forma similar a estos (8).

Los enterovirus se han propuesto como indicadores para la supervisión de la contaminación fecal del agua, ya que se encuentran en grandes cantidades en las aguas residuales y contaminadas; recientemente, también se ha sugerido el empleo de los adenovirus por su resistencia a los tratamientos convencionales del agua (1,39). En este contexto, se requieren evaluaciones enmarcadas en el perfil epidemiológico de estos virus en Colombia, así como contar con la capacidad instalada de los laboratorios.

Agradecimientos

A la Unidad de Secuenciación de Genomas del Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud y a todas las personas que de alguna manera hicieron posible este estudio, especialmente a las autoridades sanitarias de los municipios que participaron remitiendo las muestras de agua a nuestro laboratorio.

Conflicto de Intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

Financiación

El presente estudio fue financiado por el Instituto Nacional de Salud.

Referencias

1. **Fong TT, Lipp EK.** Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: Health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005;69:357-71. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.69.2.357371.2005>
2. **Bracho M, Morón V, Luzardo M, Montiel M, Botero L.** Detección del virus de la hepatitis A, adenovirus 40 y 41 y bacteriófagos en agua para consumo humano. *Ciencia.* 2008;16:271-8.
3. **Ganesh A, Lin J.** Waterborne human pathogenic viruses of public health concern. *Int J Environ Health Res.* 2013;23:544-64. <http://dx.doi.org/10.1080/09603123.2013.769205>
4. **Leclerc H, Schwartzbrod L, Dei-Cas E.** Microbial agents associated with waterborne diseases. *Crit Rev Microbiol.* 2002;28:371-409. <http://dx.doi.org/10.1080/1040-840291046768>
5. **Iversen AM, Gill M, Barlett ER, Cubbit WD, McSwiggan DA.** Two outbreaks of foodborne gastroenteritis caused by a small round structured virus: Evidence of prolonged infectivity in a food handler. *Lancet.* 1987;8558:556-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)92933-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(87)92933-3)
6. **Prüss-Üstün A, Bos R, Gore F, Bartram J.** Safer water, better health: Costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote health. Geneva: World Health Organization; 2008. p. 60.
7. **Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Albiñana-Giménez N, Maluquer de Motes CP, Hundesa AG, Girones RL.** Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emergentes humanos. *Rev Esp Salud Pública.* 2005;79:253-69. <http://dx.doi.org/10.1590/S1135-57272005000200012>
8. **World Health Organization.** Guidelines for drinking water quality. Fourth edition. Geneva: World Health Organization; 2011. p. 398.
9. **Pusch D, Oh DY, Wolf S, Dumke R, Schroter-Bobsin U, Höhne M, et al.** Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch Virol.* 2005;150:929-47. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-004-0467-8>
10. **Ministerio de la Protección Social, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.** Resolución 2115 de 22 junio de 2007. Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. Diario Oficial 46679. Bogotá, D.C.: Imprenta Nacional de Colombia; 2007. Fecha de consulta: 6 de abril de 2013. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/sivicap/Normatividad/Resoluci%C3%B3n%202115%20de%202007.pdf>

11. **Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Koibuchi Y, Furumai H, Ohgaki S.** Effects of rainfall on the occurrence of human adenoviruses, total coliforms, and *Escherichia coli* in seawater. *Water Sci Technol.* 2006;54:225-30. <http://dx.doi.org/10.2166/wst.2006.473>
12. **Okoh AI, Sibanda T, Gusha SS.** Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. *Int J Environ Res Pub Health.* 2010;7:2620-37. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph7062620>
13. **Lins J, Gnesh A.** Water quality indicators: Bacteria, coliphages, enteric viruses. *Int J Environ Health Res.* 2013;23:484-506. <http://dx.doi.org/10.1080/09603123.2013.769201>
14. **Gutiérrez MF, Alvarado MV, Martínez E, Ajami NJ.** Presence of viral proteins in drinkable water. Sufficient condition to consider water a vector of viral transmission? *Water Res.* 2007;41:373-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.09.022>
15. **Gutiérrez MF, Moreno S, Alvarado MV, Bermúdez A.** Análisis filogenético de las cepas de rotavirus y virus de la hepatitis A encontradas en agua de consumo en el municipio de Quibdó, Chocó. *Biomédica.* 2009;29:209-17. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v29i2.23>
16. **Peláez D, Rodríguez JA, Rocha EL, Rey GJ.** Estandarización de un método de concentración y detección de virus entéricos en aguas de consumo. *Biomédica.* 2010;30:276-82. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v30i2.191>
17. **Rincón CJ, Rodríguez-Malagón N, Mariño C, Mojica JA, de la Hoz-Restrepo F.** Estimación de la fuerza de infección de hepatitis A en Colombia, aplicando modelos catalíticos. *Rev Salud Pública.* 2012;14:282-95. <http://dx.doi.org/10.1590/S0124-00642012000200009>
18. **Manrique-Abril FG, Tigne DBY, Bello SE, Ospina JM.** Agentes causantes de diarrea en niños menores de 5 años en Tunja, Colombia. *Rev Salud Pública.* 2006;8:88-97. <http://dx.doi.org/10.1590/S0124-00642006000100008>
19. **Cáceres DC, Peláez D, Sierra N, Estrada E, Sánchez L.** La carga de la enfermedad por rotavirus en niños menores de cinco años, Colombia, 2004. *Rev Panam Salud Pública.* 2006;20:9-21. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892006000700002>
20. **Instituto Nacional de Salud.** Informe final de vigilancia centinela de enfermedad diarreica aguda causada por rotavirus, Colombia, 2014. Bogotá, D.C.: INS; 2015.
21. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del laboratorio de EDA viral. Vigilancia centinela de la enfermedad diarreica aguda de origen viral, Colombia 2015. Bogotá, D.C.: INS; 2016.
22. **González MM, Giraldo AM, Quintero L, Padilla L, Sarmiento L, Castaño JC.** Prevalencia de enterovirus en recién nacidos y lactantes que consultaron a un centro de atención de primer nivel, Armenia, Colombia, 2009. *Biomédica.* 2011;31:545-51. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v31i4.424>
23. **Craun GF, Brunkard JM, Yoder JS, Roberts VA, Carpenter J, Wade T, et al.** Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:507-28. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00077-09>
24. **Sánchez-Triana E, Ahmed K, Awe Y.** Prioridades ambientales para la reducción de la pobreza en Colombia. Bogotá, D.C.: Banco Mundial; 2006.
25. **World Health Organization.** Constraints affecting the development of the water supply and sanitation sector. Geneva: World Health Organization; 2003.
26. **Kayser GL, Amjad U, Dalcanale F, Bartram J, Bentley ME.** Drinking water quality governance: A comparative case study of Brazil, Ecuador, and Malawi. *Environmental Sci Policy.* 2015;48:186-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envsci.2014.12.019>
27. **Lee E, Schwab K.** Deficiencies in drinking water distribution systems in developing countries. *J Water Health.* 2005;3:109-27.
28. **Lee SH, Kim SJ.** Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Res.* 2002;36:248-56. [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00199-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00199-3)
29. **Ali MA, Al-Herrawy AZ, El-Hawaary SE.** Detection of enteric viruses, *Giardia* and *Cryptosporidium* in two different types of drinking water treatment facilities. *Water Res.* 2004;38:3931-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2004.06.014>
30. **Vivier JC, Ehlers MM, Grabow WO.** Detection of enteroviruses in treated drinking water. *Water Res.* 2004;38:2699-705. [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00433-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00433-X)
31. **Ye XY, Ming X, Zhang YL, Xiao WQ, Huang XN, Cao YG, et al.** Real-time PCR detection of enteric viruses in source water and treated drinking water in Wuhan, China. *Curr Microbiol.* 2012;65:244-53. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-012-0152-1>
32. **LeChevallier MW, Au KK.** Water treatment and pathogen control: Process efficiency in achieving safe drinking water. London, UK: IWA Publishing; 2004. p. 90.
33. **Guzmán BL, Nava G, Díaz P.** Calidad del agua para consumo humano y su asociación con la morbilidad en Colombia, 2008-2012. *Biomédica.* 2015;35:177-90. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i0.2511>
34. **Davies JM, Mazumder A.** Health and environmental policy issues in Canada: The role of watershed management in sustaining clean drinking water quality at surface sources. *J Environ Manage.* 2003;68:273-86. [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-4797\(03\)00070-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-4797(03)00070-7)
35. **Foran J, Brosnan T, Conner M, Delfino J, Depinto J, Dickson K, et al.** A framework for comprehensive, integrated, watershed monitoring in New York City. *Environ Monit Assess.* 2000;62:147-67. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006266325869>
36. **Grabow WO, Taylor MB, Villiers JC.** New methods for the detection of viruses: Call for review of drinking-water quality guidelines. *Water Sci Technol.* 2001;43:1-8.
37. **Mattison K, Bidawid S.** Analytical methods for food and environmental viruses. *Food Environ Virol.* 2009;1:107-22. <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-009-9017-6>
38. **Bosch A, Sánchez G, Abbaszadegan M, Carducci A, Guix S, Le Guyader FS, et al.** Analytical methods for virus detection in water and food. *Food Analytical Methods.* 2011;4:4-12. <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-010-9161-5>
39. **Vieira CB, Corrêa A, de Jesus MS, Luz SLB, Wyn-Jones P, Kay D, et al.** Virus surveillance under different season scenarios of the Negro River Basin, Amazonia, Brazil. *Food Environ Virol.* 2016;8:1-13. <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-016-9226-8>

ARTÍCULO ORIGINAL

Prevalencia y curso clínico de la infección por dengue en adultos mayores con cuadro febril agudo en un hospital de alta complejidad en Cali, Colombia

Fernando Rosso^{1,2,3}, Sara Vanegas⁴, Sarita Rodríguez², Róbinson Pacheco^{2,3}

¹ Departamento de Medicina Interna-Infectología, Fundación Clínica Valle del Lili, Cali, Colombia

² Centro de Investigaciones Clínicas, Fundación Clínica Valle del Lili, Cali, Colombia

³ Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad ICESI, Cali, Colombia

⁴ Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad ICESI, Cali, Colombia

Introducción. Hay pocas series de casos publicadas sobre la prevalencia y el curso clínico del dengue en adultos mayores con síndrome febril, habitantes en zonas endémicas para la infección. Se cree que tales casos presentan una baja prevalencia pero revisten mayor gravedad, y más complicaciones y mortalidad.

Objetivos. Describir la prevalencia y el curso clínico del dengue en adultos mayores atendidos por síndrome febril agudo en un hospital de alta complejidad de una zona endémica de la enfermedad.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio observacional descriptivo en una cohorte de pacientes adultos mayores con diagnóstico serológico confirmado de dengue entre el 2011 y el 2014.

Resultados. Se evaluaron las historias clínicas de 235 pacientes adultos mayores con cuadro febril agudo y se confirmó la infección en solo 43 (18,3 %) de ellos. La mediana de edad de los pacientes con diagnóstico confirmado fue de 71 años y 48,7 % correspondía a mujeres; 89 % de los pacientes presentaba al menos otra enfermedad concomitante; 51,4 % fue positivo para Ag NS1, 27 % para IgM y 54,1 % para IgG, en tanto que 64,8 % correspondió a infecciones secundarias. Los casos clasificados como dengue fueron 13 (35 %), como dengue con signos de alarma, 16 (43 %), y como dengue grave, 8 (22 %). Se hospitalizó a 56,7 % de los pacientes, de los cuales 21,6 % fue internado en la unidad de cuidados intensivos. No hubo casos fatales.

Conclusión. La infección por dengue fue frecuente en adultos mayores como causa de síndrome febril agudo. Una importante proporción requirió hospitalización y presentó complicaciones, sin embargo, el manejo adecuado evitó los casos fatales.

Palabras clave: dengue grave/epidemiología, anciano, hospitalización, fiebre, mortalidad, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2961>

Prevalence and clinical course of dengue infection in elderly patients with acute febrile illness in a tertiary care hospital in Cali, Colombia

Introduction: Little is known about the prevalence and clinical course of dengue infection in elderly patients living in endemic areas; it is presumed that there is a lower prevalence but higher severity, complications and mortality.

Objective: To describe the prevalence and clinical course of dengue infection in elderly patients who were admitted to a referral care center for infectious diseases in an endemic region.

Materials and methods: We conducted an observational and descriptive study between 2011 and 2014, using a cohort of elderly patients with serological diagnosis of dengue.

Results: A total of 235 febrile elderly patients were assessed, of which 43 patients (18.3%) were found to have dengue. The median age was 71 years; 48.7% were female, and 89% of patients had at least one comorbid condition. According to the serological tests, 51.4% of cases were positive for NS1 Ag, 27% for IgM and 54.1% for IgG, while 64.8% were secondary infections. Dengue was diagnosed in 13 patients (35%), dengue with warning signs in 16 cases (43%), and severe dengue in 8 cases (22%). Nearly 56.7% of patients were admitted to hospital and 21.6%, to the intensive care unit. None died.

Contribución de los autores:

Róbinson Pacheco y Fernando Rosso: desarrollo de la idea, diseño del estudio y revisión crítica del contenido

Sarita Rodríguez: creación de la base de datos, análisis de la información, revisión crítica del contenido

Sara Vanegas: revisión de la literatura, diseño del estudio, recolección de datos y análisis de la información

Todos los autores participaron en la redacción del manuscrito.

Conclusion: We found dengue infection to be more frequent than expected in this sample of elderly patients, due to acute febrile syndrome. Elderly patients also required higher rate of hospitalization and had more complications, however there were no deaths due to good management.

Key words: severe dengue/epidemiology, aged, hospitalization, fever, mortality, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2961>

El virus del dengue es un arbovirus de ARN perteneciente a la familia Flaviviridae, género *Flavivirus*, que se transmite a través de la picadura de mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Hasta hace poco se conocían cuatro serotipos del virus (DENV 1-4), con una homología genética de entre 67 y 75 % (1). Recientemente, se describió la posible existencia de un nuevo serotipo 5 (DENV-5), aislado en el 2013 en Malasia (2).

Las infecciones por este virus se clasifican como fiebre por dengue, dengue con signos de alarma y dengue grave (3). Generalmente, el cuadro clínico es benigno y de resolución espontánea, pero puede progresar a formas graves. Se sabe que la infección primaria por el DENV-1 y el DENV-3 se correlaciona con casos más graves, mientras que las infecciones secundarias por el DENV-2 se asocian con el compromiso multisistémico (4).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de 3.900 millones de personas en el mundo están en riesgo de infección por el virus del dengue, y cada año se reportan entre 50 y 100 millones de casos de la infección (5-7). En el 2014 se reportaron en Colombia 110.473 casos de dengue, con una incidencia de 413 casos por cada 100.000 habitantes, de los cuales 107.696 casos se clasificaron como dengue (97,5 %) y 2.775 como dengue grave (2,5 %), y se reportaron 294 muertes asociadas al dengue. El departamento del Valle del Cauca es una región hiperendémica en la cual se ha reportado la circulación de tres serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-4) (8,9).

En el último siglo se registró un aumento significativo en la esperanza de vida de la humanidad, lo que significa que la población anciana es cada vez mayor y, en consecuencia, hay una creciente demanda de servicios de salud en esta población.

El dengue en adultos mayores se relaciona con una mayor morbimortalidad (10,11), probablemente por la disminución progresiva de la actividad del sistema inmunológico debida a la edad, a la capacidad del virus de interferir con la producción de las células T y B, y a la disminución de la producción de citocinas (12-14). Algunos investigadores han señalado que la infección por dengue en adultos mayores puede progresar a cuadros más graves, dado que estos pacientes presentan mayor permeabilidad capilar y predisposición a las hemorragias (15,16). Por otro lado, la presencia concomitante de otras enfermedades, como la hipertensión y la diabetes, se ha descrito como un factor de riesgo para el dengue hemorrágico (15-17).

Con respecto al cuadro clínico, Lye, *et al.*, reportaron menor frecuencia de exantema, fiebre, artralgias, hemorragia mucocutánea, coagulopatía o hepatomegalia. Con relación a los exámenes de laboratorio, no se reportó leucopenia, hemoconcentración ni alteración de la función hepática (18). Otros autores han reportado un mayor riesgo de bacteriemia, hemorragia gastrointestinal y complicaciones renales, y estancias hospitalarias más prolongadas (15,18,19). La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la población mayor de 65 años como de alto riesgo para desarrollar formas graves de dengue.

El objetivo de este estudio fue describir la prevalencia y el curso clínico del dengue en adultos mayores (de 65 años de edad o más) con un cuadro de síndrome febril agudo, atendidos en la Fundación Clínica Valle del Lili de Cali, Colombia, entre enero de 2011 y diciembre de 2014.

Materiales y métodos

Tipo de estudio

Se hizo un estudio observacional descriptivo de una serie de casos. Los criterios de selección incluyeron a pacientes de ambos sexos con 65 años o más de edad, que consultaron en la institución con un cuadro febril agudo y para quienes los médicos tratantes solicitaron, al menos, una prueba serológica o de antígeno para dengue. La población de estudio se seleccionó a partir de los registros del laboratorio de microbiología de la institución.

Correspondencia:

Fernando Rosso, Centro de Investigaciones Clínicas, Fundación Clínica Valle del Lili, Avenida Simón Bolívar Carrera 98 N° 98-49, Cali, Colombia

Teléfono: (572) 331 9090, extensión 7105

frosso07@gmail.com

Recibido: 04/07/15; aceptado: 03/05/16

Toda la información clínica, paraclínica y epidemiológica se consultó de manera retrospectiva en los registros médicos, de laboratorio y del comité de vigilancia epidemiológica institucional.

Para el diagnóstico del dengue se utilizó la prueba inmunocromatográfica Dengue Duo® de Bioline según las recomendaciones del fabricante, la cual detecta anticuerpos diferenciales de tipo de IgG e IgM, y el antígeno NS1 del virus del dengue. Las infecciones se clasificaron como primarias o secundarias de acuerdo con la ausencia o presencia de anticuerpos IgG en el suero tomado durante la fase aguda. Los casos de dengue se clasificaron como dengue, dengue con signos de alarma, dengue grave y muerte por dengue, según los criterios de la OMS (3).

Análisis de los datos

Toda la información clínica, paraclínica y epidemiológica se recolectó en una base de datos electrónica. En el análisis univariado, se evaluó la distribución de las variables numéricas mediante la prueba de Shapiro-Wilk, los datos se resumieron usando como promedios la desviación estándar o la mediana, y los rangos intercuartílicos según correspondiera. Las variables cualitativas se

expresaron como proporciones. Los análisis se hicieron con el paquete estadístico Stata® (Stata Corp, 2011, Stata 12 Base Reference Manual, College Station, TX, USA).

Consideraciones éticas

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Humanos de la Fundación Clínica Valle de Lili, según acta No. 9 del 20 abril de 2015.

Resultados

Entre enero de 2011 y diciembre de 2014, se evaluaron las muestras de 3.388 pacientes con sospecha de dengue en el Laboratorio de Microbiología de la Fundación Clínica Valle de Lili. De los pacientes evaluados, 235 (6,9 %) eran pacientes de 65 años o más y la proporción de estos con, al menos, una prueba positiva para dengue fue de 18,3 % (43/235) (figura 1). A partir de las pruebas realizadas se obtuvo un número global de resultados positivos de 17,5 %, la seropositividad por grupo etario fue de 18,2 % para menores de 18 años, 16,9 %, en la población entre 18 y menores de 65 años, y 18,3 %, en pacientes mayores de 65 años.

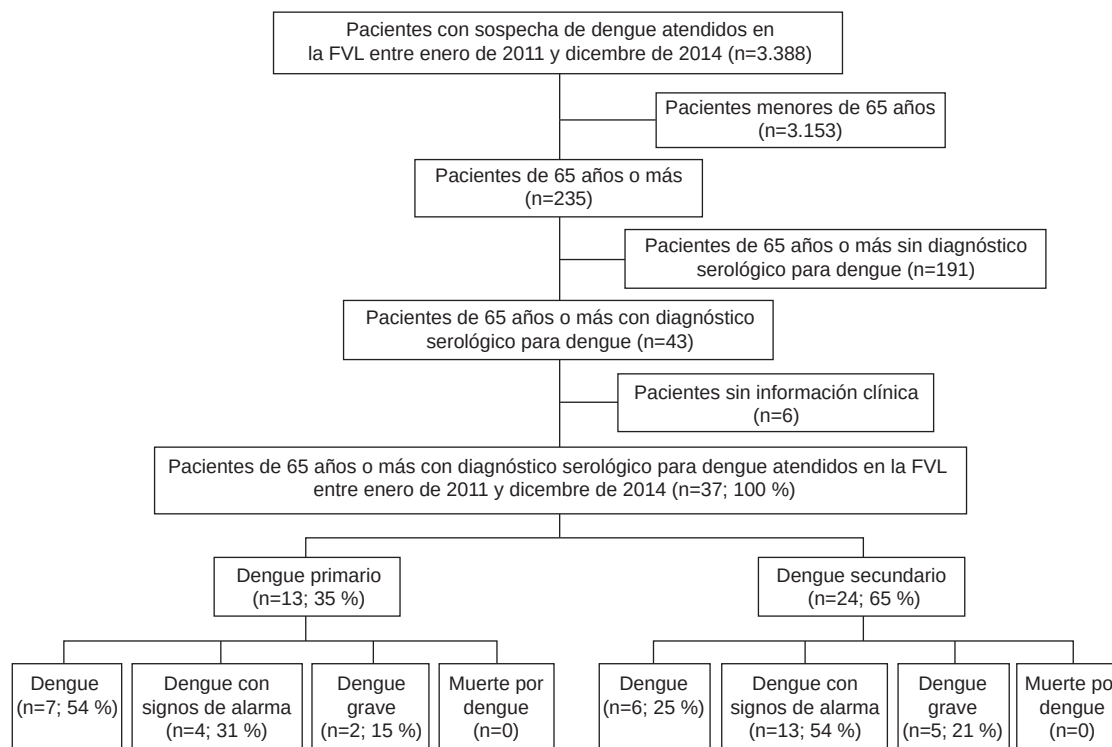


Figura 1. Diagrama para la selección y la clasificación de pacientes de 65 años o más con diagnóstico de dengue
FVL: Fundación Valle de Lili

Se excluyeron seis pacientes por falta de información en los registros médicos. De los 37 pacientes que cumplieron con los criterios de selección, 51 % (19/37) correspondió a hombres, la mediana de la edad fue de 71 años (rango intercuartílico, RIC: 68-80) y 97 % procedía de Cali (cuadro 1).

Con relación a las enfermedades concomitantes, la más frecuente fue la hipertensión arterial en 22 (59,5 %) pacientes, seguida de hipotiroidismo en 11 (29,7 %), diabetes mellitus en 9 (24,3 %) y neoplasias malignas en 8 (21,6 %) (cuadro 1).

Los hallazgos clínicos más frecuentes en el momento de la consulta fueron la fiebre (92 %; 34/37), las mialgias (81 %; 30/37) y la cefalea (49 %; 18/37), en tanto que solo 1 % de los pacientes llegó en estado de postración.

La mediana de días entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico serológico fue de cuatro días (RIC: 0-13); 51,4 % de los pacientes tuvo resultados positivos en la prueba para Ag NS1, 54,1 %, para IgG, y 27 %, para IgM. Por otra parte, 35 % de las infecciones se clasificaron como primarias y 65 % como secundarias (cuadro 2). Entre los pacientes hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos, 62,5 % presentó infecciones primarias.

Con relación a los exámenes de laboratorio, los resultados relevantes fueron la elevación de las transaminasas en 65 % de los casos y el descenso en los valores de plaquetas, con una media de 64.000/ml; 43 % (3/7) de los pacientes que desarrollaron formas graves de dengue presentó valores de LDH superiores a 300 U/l, en tanto que solo en uno se registraron por encima de 500 U/l (cuadro 3). Por otro lado, la proporción de aquellos que fueron hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos con valores de aspartato aminotransferasa (AST) y de alanino aminotransferasa (ALT) diez veces por encima del límite superior (>400 U/l) fue de 25 % y de 12,5 %, respectivamente.

Con relación a las manifestaciones clínicas, 24 (65 %) pacientes presentaron, al menos, un signo de alarma. El dolor abdominal intenso y continuo se presentó en 14 (37,8 %); la acumulación de líquidos en 11 (29,7 %), de los cuales seis presentaron derrame pleural; seis presentaron edema periférico y, dos, ascitis. Se reportó hipotermia en diez (27 %). Ocho casos se clasificaron como dengue grave, con manifestaciones como hemorragia gastrointestinal en uno, y se documentó daño grave de los órganos en tres pacientes con hepatitis, tres con insuficiencia renal aguda y dos con síndrome de choque por dengue. Ocho pacientes fueron

Cuadro 1. Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes con diagnóstico de dengue

Característica	n (%)
Edad	Mediana=71 (RIC=68-80)
Sexo	
Masculino	19 (51,3)
Femenino	18 (48,7)
Régimen de afiliación	
Contributivo	34 (91,9)
Particular	2 (5,4)
Subsidiado	1 (2,7)
Procedencia	
Cali	36 (97,3)
Fuera de Cali	1 (2,7)
Síntomas en el momento de la consulta	
Fiebre	34 (91,9)
Mialgias	30 (81,1)
Cefalea	18 (48,6)
Exantema	11 (29,7)
Anorexia	10 (27)
Artralgias	10 (27)
Náusea	8 (21,6)
Dolor retroocular	4 (10,8)
Postración	1 (2,7)
Enfermedades concomitantes	
Hipertensión arterial sistémica	22 (59,5)
Hipotiroidismo	11 (29,7)
Diabetes mellitus	9 (24,3)
Cardiopatía	9 (24,3)
Neoplasias malignas	8 (21,6)
Dislipidemia	5 (13,5)
Otras	12 (32,4)
Trasplante de riñón	1 (2,7)
Transfusiones	7 (18,9)

Cuadro 2. Clasificación de las infecciones primarias y secundarias

NS1	IgM	IgG	Infecciones primarias	Infecciones secundarias
Positivo	Negativo	Negativo	10 (27,2 %)	
Negativo	Positivo	Negativo	1 (2,7 %)	
Negativo	Negativo	Positivo		11 (29,7 %)
Negativo	Positivo	Positivo		6 (16,2 %)
Positivo	Negativo	Positivo		4 (10,8 %)
Positivo	Positivo	Negativo	2 (5,4 %)	
Positivo	Positivo	Positivo		3 (8,1 %)
Negativo	Negativo	Negativo		
Total			13 (35 %)	24 (65 %)

hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos y la mediana de estancia en dicha unidad fue de 2,5 (RIC: 0,5-10) días. La mediana de estancia hospitalaria fue de cuatro días (RIC: 1-8) (cuadro 4). Con respecto a los parámetros hematológicos, no hubo diferencias significativas entre el grupo de pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos y quienes fueron atendidos en otras secciones.

Cuadro 3. Resultados de laboratorio en pacientes de 65 años o más con diagnóstico de dengue

Resultados de laboratorio	n (%)
Aumento en los valores de AST/TGO	88,7 (46-213,9)*
Aumento en los valores de ALT/TGP	70,3 (37,1-138,1)*
Aumento en los valores de LDH**	323,2±99,8
Plaquetas (x 10 ³ u/l)	64 (36-130)*
Leucocitos (x 10 ³ u/l)	4,3 (3,5-8,1)*
Neutrófilos (x 10 ³ u/l)	1,8 (1-3,6)*
Linfocitos (x 10 ³ u/l)	0,9 (0,5-1,6)*

* Mediana (rango intercuartílico, RIC)

**Promedio ± desviación estándar

AST: aspartato transaminasa; TGO: transaminasa glutámico-oxaloacética; ALT: alanino aminotransferasa;

TGP: transaminasa glutámico pirúvica; LDH: deshidrogenasa láctica

Cuadro 4. Manifestaciones clínicas de la enfermedad en pacientes de 65 años o más con diagnóstico de dengue

Características	n (%)
Dengue	13 (35)
Signos de alarma durante la enfermedad	24 (65)
Dolor abdominal intenso y continuo	14 (37,8)
Vómito persistente	6 (16,2)
Hipotensión postural-lipotimia	5 (13,5)
Hepatomegalia dolorosa	2 (5,4)
Somnolencia e irritabilidad	4 (10,8)
Disminución de la diuresis (oliguria)	1 (2,7)
Hipotermia	10 (27)
Acumulación de líquidos	11 (29,7)
Ascitis	2 (18,2)
Edema periférico	6 (54,5)
Derrame pleural	6 (54,5)
Manifestaciones hemorrágicas	8 (21,6)
Petequias	6 (16,2)
Hemorragia gastrointestinal	2 (5,4)
Epistaxis	1 (2,7)
Hematuria	4 (10,8)
Dengue grave	8 (21,6)
Choque por dengue	2 (5,4)
Muerte por dengue	0 (0)
Infección asociada a la atención en salud	3 (8)
Bacteriemia	2 (5,4)
Infección de vías urinarias	2 (5,4)
Neumonía	2 (5,4)

Las complicaciones asociadas a la atención incluyeron el edema pulmonar en un paciente, y tres desarrollaron infecciones asociadas a la atención en salud (cuadro 4). Durante el periodo de estudio no se reportó ninguna muerte.

Los pacientes fueron tratados tempranamente con reanimación con líquidos endovenosos cristaloides, solución salina al 0,9 % y lactato de Ringer; en la fase de convalecencia se prestó atención a la posibilidad de que se presentara hipervolemia.

Discusión

Este es el primer estudio que se hace en el país sobre la prevalencia y el curso clínico de la infección por dengue y los resultados asociados en pacientes mayores de 65 años provenientes de áreas de alta transmisión del virus.

La seroprevalencia en el grupo de pacientes menores de 18 años y en el de 18 a 65 años, así como en el grupo de los adultos mayores, fue similar, lo cual difiere de lo reportado por Lye y Rowe, quienes encontraron una menor proporción en los grupos de ancianos. Llama la atención que, a pesar de la exposición acumulada a lo largo de la vida, el riesgo de infección siga siendo elevado en esta población (18,19).

Con relación a los signos y síntomas en el momento del diagnóstico, al igual que en otras series (3,18-21), en este estudio se encontró que la fiebre, las mialgias, la cefalea y las artralgias fueron los más frecuentes (cuadro 5).

Como lo han señalado otros autores, la edad avanzada es, *per se*, un factor de riesgo para desarrollar formas graves de dengue con desenlaces fatales (14-16,18,19), lo cual se ha explicado aduciendo los cambios en el sistema inmunitario, la menor efectividad de la activación y diferenciación de las células en la reacción primaria, y la disminución en la reacción de los linfocitos T y B. Otros hallazgos han demostrado la disminución de algunas citocinas, como la IL-2, y el aumento de la IL-6 (19,22-24). Por otro lado, se ha reportado un mayor riesgo de bacteriemia, hemorragia gastrointestinal y complicaciones renales, así como estancias hospitalarias más largas (3,18-20).

En el presente estudio se encontró infección bacteriana concomitante en tres pacientes (8 %), lo cual es similar a lo reportado en series del sudeste asiático en donde los pacientes que desarrollaron infecciones asociadas a la atención en salud también presentaron neutrofilia (19,21,25). Otra complicación que se reporta con frecuencia en esta población es la falla renal aguda, aunque en este estudio solo tres pacientes presentaron esta condición y requirieron internación en la unidad de cuidados intensivos (19).

El efecto de la infección por dengue en el hígado es conocido; se sabe que probablemente esté mediado por una intensa reacción del sistema inmunitario (26,27). En este estudio se encontró una mayor proporción de pacientes con alteración de las transaminasas, en comparación con lo

Cuadro 5. Principales hallazgos clínicos en pacientes de más de 65 años con diagnóstico serológico de dengue según los estudios citados

Estudio	Rosso, et al., 2015 n=37	Rowe, et al., 2014 n=295	Lee, et al., 2013 n=31	Lye, et al., 2010 n=66	Lee, et al., 2008 n=66	García-Rivera, et al. 2003 n=822
Síntomas más frecuentes al consultar						
Fiebre	34 (91,9)	273 (92,5)	29 (93,5)	61 (92)	60 (90,9)	118 (97,5)
Mialgias	30 (81,1)	5495 (82,1)	6 (19,4)	40 (61)	12 (18,2)	-
Cefalea	18 (48,6)	3287 (49,1)	7 (22,6)	40 (61)	30 (45,4)	-
Exantema	11 (29,7)	3186 (47,6)	2 (6,5)	25 (38)	10 (15,2)	27 (25,7)
Anorexia	10 (27)	-	-	23 (35)	-	-
Artralgias	10 (27)	-	1 (3,2)	40 (61)	7 (10,6)	-
Signos de alarma						
Dolor abdominal intenso	14 (37,8)	66 (22,4)	-	10 (15)	22 (33,3)	-
Disminución repentina de temperatura, hipotermia	10 (27)	-	-	-	-	-
Vómito persistente	6 (16,2)	0 (0)	-	24 (36)	11 (16,7)	-
Hipotensión postural, lipotimia	5 (13,5)	-	-	0	16 (24,2)	-
Acumulación de líquidos	11 (29,7)	4 (1,4)	-	0	52 (78,8)	2 (2,2)
Manifestaciones hemorrágicas	8 (21,6)	37 (12,5)	6 (19,4)	2 (3)	56 (84,8)	-
Hemorragia gastrointestinal	2 (5,4)	40 (0,6)	-	0	21 (32)	8 (8,1)
Hematuria	4 (10,8)	5 (1,7)	-	0	7 (10,6)	3 (2,9)
Enfermedad crónica						
Hipertensión arterial sistémica	22 (59,5)	157 (53,2)	11 (35,3)	32 (48)	35 (53)	-
Hipotiroidismo	11 (29,7)	-	-	-	-	-
Diabetes mellitus	9 (24,3)	64 (21,7)	8 (25,8)	11 (17)	19 (28,8)	-
Cardiopatía	9 (24,3)	-	4 (12,9)	4 (6)	2 (3)	-
Neoplasias malignas	8 (21,6)	4 (1,4)	3 (9,7)	-	4 (6)	-
Desenlace de la enfermedad						
Choque	2 (5,4)	6 (2,0)	0 (0)	-	7 (10,6)	0
Muerte	0 (0)	0 (0)	-	0	5 (7,6)	3 (4,3)
Estancia hospitalaria	4 (1-8)	-	7,4±5,8	4 (3,8)	7,9±4,9	-
Hospitalización en la unidad de cuidados intensivos	8 (21,6)	2 (0,7)	2 (6,5)	0	-	-
Estancia en la unidad de cuidados intensivos	2,5 (0,5-10)	-	0,7±2,8	-	-	-

reportado por Kuo, *et al.*, pues la proporción de quienes tenían niveles diez veces por encima del límite superior de AST y ALT fue: 25 % Vs. 11,1 % y 12,5 % Vs. 7,4 %, respectivamente; sin embargo, los niveles de transaminasas de los hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos fueron más bajos que los reportados en otras series (26,28).

Con respecto a las alteraciones bioquímicas como predictores de la gravedad, algunos autores han reportado la relación entre las alteraciones en los niveles de proteína C reactiva, de lactato deshidrogenasa (LDH) y de albúmina, y el desarrollo del dengue grave (29). En este estudio la proporción de pacientes atendidos en la unidad de cuidados intensivos con alteración de la LDH fue mayor (43%), mientras que en el grupo de los que no fueron ingresados en dicha unidad no se presentaron estas alteraciones evaluadas con el mismo punto de corte.

Se ha determinado, asimismo, que tanto los niveles de carga viral como de antígeno NS1 se correlacionan con el daño endotelial y las hemorragias graves en el dengue (25,30-32).

Además del compromiso hepático, se ha descrito el de los sistemas nervioso central y cardiovascular (33,34), sin embargo, en ningún paciente de este estudio se registraron estas complicaciones, lo cual coincide con lo reportado en otras series en ancianos (19,21,35).

Igualmente, se ha reportado que los niños y las mujeres tienen mayor riesgo de desarrollar dengue grave (36), así como la infección por determinados serotipos, como el DENV-2 (37).

Sería de esperar que los pacientes ancianos provenientes de áreas hiperendémicas como Cali desarrollaran en menor proporción infecciones primarias debido a la exposición acumulada; sin embargo, llama la atención el alto porcentaje de

infecciones primarias en la población de estudio, en tanto que en los hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos se encontró una menor proporción de infecciones secundarias, a diferencia de lo reportado en otras series (7,38-40). Esto respondería a la posible presencia de infección por serotipos de dengue con mayor capacidad para producir las condiciones graves (4,22). Además, alrededor de 50 % de los pacientes del estudio con infecciones secundarias presentó al menos un signo de alarma.

De acuerdo con lo reportado en la literatura científica, los pacientes con infección secundaria desarrollan manifestaciones clínicas más graves debido al mecanismo por el cual se genera un aumento de la reacción a la infección por acción de los anticuerpos IgG que, al unirse al virus, son incapaces de neutralizarlo y generan un complejo antígeno-anticuerpo que facilita su entrada en la célula, y el consecuente aumento de su replicación y de la gravedad del cuadro clínico. Por otro lado, un mecanismo de reacción cruzada de las células T de memoria y la producción de sustancias inductoras de inflamación aumentaron la permeabilidad capilar en el endotelio vascular (24,41-43).

Es importante mencionar que este estudio se llevó a cabo en una institución de alta complejidad que sirve de referencia para enfermedades infecciosas, en la cual generalmente se atienden los casos más complejos, por lo que una gran proporción de la población de estudio presentó signos de alarma y algunos pacientes desarrollaron formas graves que exigieron su atención en la unidad de cuidados intensivos sin que se presentara ningún caso fatal. Los resultados del estudio sugieren que la consulta temprana podría ser el factor que más impacto tiene en el desenlace de la enfermedad en estos pacientes; además, con un diagnóstico oportuno y un manejo adecuado, la mortalidad es evitable.

Conflicto de intereses

Ninguno de los investigadores tiene conflictos de intereses.

Financiación

Centro de Investigaciones Clínicas, Fundación Clínica Valle del Lili, y Universidad ICESI.

Referencias

1. Weiskopf D, Angelo MA, Sidney J, Peters B, Shrestha S, Sette A. Immunodominance changes as a function of the infecting dengue virus serotype and primary versus secondary infection. *J Virol*. 2014;88:11383-94. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01108-14>
2. Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India*. 2014;71:67-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.09.011>
3. World Health Organization. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: World Health Organization; 2009.
4. Velandia ML, Castellanos JE. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*. 2011;15:33-43. [http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70074-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70074-1)
5. Kourí G. El dengue, un problema creciente de salud en las Américas. *Rev Panam Salud Pública*. 2006;19:143-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892006000300001>
6. World Health Organization. Dengue and severe dengue. Fecha de consulta: 9 de abril de 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
7. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen VV, Wills B. Dengue. *N Engl J Med*. 2012;366:1423-32. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1110265>
8. Rosso F, Vélez JD. Dengue. Carta de la Salud. 2013. Fecha de consulta: 15 de abril de 2015. Disponible en: <http://www.valledellili.org/sites/default/files/files/carta-de-la-salud-marzo-2013.pdf>
9. Instituto Nacional de Salud. Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 53 de 2014. Fecha de consulta: 15 de abril de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiologico/2014%20Boletn%20epidemiologico%20semana%2053.pdf>
10. Omran AR. The epidemiologic transition: A theory of the epidemiology of population change. *Milbank Q*. 2005;83:731-57. <http://dx.doi.org/10.1093/jhmas/jrp058>
11. Halstead SB. Dengue in the health transition. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi*. 1994;10:S2-14.
12. Opal SM, Girard TD, Ely EW. The immunopathogenesis of sepsis in elderly patients. *Clin Infect Dis*. 2005;41:S504-12. <http://dx.doi.org/10.1086/432007>
13. Guzmán MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015;385:453-65. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60572-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60572-9)
14. Pang J, Salim A, Lee VJ, Hibberd ML, Chia KS, Leo YS, et al. Diabetes with hypertension as risk factors for adult dengue hemorrhagic fever in a predominantly dengue serotype 2 epidemic: A case control study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1641. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001641>
15. García-Rivera EJ, Rigau-Pérez JG. Dengue severity in the elderly in Puerto Rico. *Rev Panam Salud Pública*. 2003;13:362-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-4989200300500004>
16. Liu CC, Huang KJ, Huang MC, Lin JJ, Wang SM, Liu JJ, et al. High case-fatality rate of adults with dengue hemorrhagic fever during an outbreak in non-endemic Taiwan: Risk factors for dengue-infected elders. *Am J Infect Dis*. 2008;4:10-7. <http://dx.doi.org/10.3844/ajidsp.2008.10.17>
17. Sam SS, Omar SF, Teoh BT, Abd-Jamil J, AbuBakar S. Review of dengue hemorrhagic fever fatal cases seen among adults: A retrospective study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:1-7. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002194>

18. **Lye DC, Lee VJ, Sun Y, Leo YS.** The benign nature of acute dengue infection in hospitalized older adults in Singapore. *Int J Infect Dis.* 2010;14:e410-3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2009.06.026>
19. **Rowe EK, Leo YS, Wong JGX, Thein TL, Gan VC, Lee LK, et al.** Challenges in dengue fever in the elderly: A typical presentation and risk of severe dengue and hospital-acquired infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e2886. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002777>
20. **Leo YS, Thein TL, Fisher DA, Low JG, Oh HM, Narayanan RL, et al.** Confirmed adult dengue deaths in Singapore: 5-year multi-center retrospective study. *BMC Infect Dis.* 2011;11:123. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-11-123>
21. **Lee IK, Liu JW, Yang KD.** Clinical and laboratory characteristics and risk factors for fatality in elderly patients with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79:149-53.
22. **Guzmán MG, Kouri G, Bravo J, Valdés L, Susana V, Halstead SB.** Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int J Infect Dis.* 2002;6:118-24. [http://dx.doi.org/10.1016/S1201-9712\(02\)90072-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1201-9712(02)90072-X)
23. **Doggett DL, Chang MP, Makinodan T, Strehler B.** Cellular and molecular aspects of immune system aging. *Mol Cell Biochem.* 1981;37:137-56. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02354883>
24. **Mathew A, Kurane I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, et al.** Impaired T cell proliferation in acute dengue infection. *J Immunol.* 1999;162:5609-15.
25. **Lee IK, Liu JW, Yang KD.** Clinical characteristics and risk factors for concurrent bacteremia in adults with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72:221-6.
26. **Kuo CH, Tai DI, Chang-Chien CS, Lan CK, Chiou SS, Liaw YF.** Liver biochemical tests and dengue fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;47:265-70.
27. **Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, et al.** Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis.* 1997;176:313-21. <http://dx.doi.org/10.1086/514047>
28. **Tan SS, Bujang MA.** The clinical features and outcomes of acute liver failure associated with dengue infection in adults: A case series. *Braz J Infect Dis.* 2013;17:164-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.09.007>
29. **Villar-Centeno LA, Lozano-Parra A, Salgado-García D, Herrán OF.** Alteraciones bioquímicas como marcadores predictores de gravedad en pacientes con fiebre por dengue. *Biomédica.* 2013;33(Supl.1):63-9. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.732>
30. **Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al.** Vascular leakage in severe dengue virus infections: A potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis.* 2006;193:1078-88. <http://dx.doi.org/10.1086/500949>
31. **Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al.** High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2002;186:1165-8. <http://dx.doi.org/10.1086/343813>
32. **Schlesinger JJ.** Flavivirus nonstructural protein NS1: Complementary surprises. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:18879-80. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0609522103>
33. **Juneja D, Nasa P, Singh O, Javeri Y, Uniyal B, Dang R.** Clinical profile, intensive care unit course, and outcome of patients admitted in intensive care unit with dengue. *J Crit Care.* 2011;26:449-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2011.05.007>
34. **Murgue B, Deparis X, Chungue E, Cassar O, Roche C.** Dengue: An evaluation of dengue severity in French Polynesia based on an analysis of 403 laboratory-confirmed cases. *Trop Med Int Heal.* 1999;4:765-73. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3156.1999.00478.x>
35. **Wang CC, Lee IK, Su MC, Lin HI, Huang YC, Liu SF, et al.** Differences in clinical and laboratory characteristics and disease severity between children and adults with dengue virus infection in Taiwan, 2002. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103:871-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.04.024>
36. **Anders KL, Nguyet NM, Chau NVV, Hung NT, Thuy TT, Lien LB, et al.** Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84:127-34. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0476>
37. **Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al.** Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology.* 1997;230:244-51. <http://10.1006/viro.1997.8504>
38. **Wichmann O, Hongsiriwon S, Bowonwatanuwong C, Chotivanich K, Sukthana Y, Pukrittayakamee S.** Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand. *Trop Med Int Health.* 2004;9:1022-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01295.x>
39. **Ranjit S, Kisson N.** Dengue hemorrhagic fever and shock syndromes. *Pediatr Crit Care Med.* 2011;12:90-100. <http://dx.doi.org/10.1097/PCC.0b013e3181e911a7>
40. **Hammond SN, Balmaseda A, Pérez L, Téllez Y, Saborío SI, Mercado JC, et al.** Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73:1063-70.
41. **Nikin-Beers R, Ciupe SM.** The role of antibody in enhancing dengue virus infection. *Math Biosci.* 2015;263:83-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mbs.2015.02.004>
42. **Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR.** Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5:518-28. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1690>
43. **Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu X, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al.** Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 2003;9:921-7. <http://dx.doi.org/10.1038/nm887>

ARTÍCULO ORIGINAL

Seroprevalencia de citomegalovirus en donantes de órganos y receptores de trasplante renal, Colombia, 2010-2014

Yazmín Rocío Arias-Murillo¹, Karime Osorio-Arango¹, Jorge Alberto Cortés², Mauricio Beltrán³

¹ Subdirección Nacional de Trasplantes y Bancos de Sangre, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

³ Dirección Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La infección por citomegalovirus ha cobrado gran importancia en los receptores de trasplantes debido a las implicaciones clínicas que puede tener en pacientes inmunocomprometidos.

Objetivo. Describir la seroprevalencia del citomegalovirus en donantes de órganos y receptores de trasplante renal a nivel nacional seleccionados de las seis regionales en que está dividido el país según las áreas de actuación de la Red Nacional de Donación y Trasplante.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo y retrospectivo que incluyó 1.813 donantes de órganos y 3.313 personas receptoras de trasplante renal, y se calculó la seroprevalencia general de IgM e IgG para citomegalovirus. La prevalencia de IgG se estratificó por sexo, grupos de edad y regional, se analizó el resultado en cada pareja de donante y receptor, y se estratificó el riesgo. Se utilizaron los paquetes estadísticos IBM SPSS®, Statistics 22, y Epi-Info 7.

Resultados. La prevalencia de IgG para citomegalovirus fue de 86,2 % en donantes y de 91,0 % en receptores de trasplante renal, con diferencias estadísticamente significativas por edad, por criterio geográfico y según su calidad de donantes o receptores. Se analizaron 1.764 parejas de donante y receptor, de las cuales 91,4 % se clasificó como de riesgo intermedio.

Conclusiones. Los resultados del presente estudio evidenciaron que las tasas de infección por citomegalovirus fueron altas y que la categorización del riesgo de los receptores de trasplante señala la necesidad de que los equipos médicos tratantes tomen medidas para minimizar los riesgos.

Palabras clave: citomegalovirus, prevalencia, estudios seroepidemiológicos, serología, donantes de tejido, trasplante de riñón.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2938>

Cytomegalovirus seroprevalence in organ donors and kidney transplant recipients, Colombia, 2010-2014

Introduction: Cytomegalovirus infections have gained high importance for individuals that have received organ transplants given the clinical implications this may have in immunocompromised patients.

Objective: To describe the seroprevalence of cytomegalovirus in organ donors and recipients of kidney transplants nationwide from the six regions established by the *Red Nacional de Donación y Trasplante*.

Materials and methods: We conducted a descriptive retrospective study that included 1,813 organ donors and 3,313 recipients of kidney transplants, and we calculated IgM and IgG seroprevalence for cytomegalovirus. IgG prevalence was stratified according to sex, age group, and region, and the results were analyzed in each donor-recipient pair and classified according to the risk. Statistical packages IBM SPSS®, Statistics 22, and Epi Info 7 were utilized.

Results: IgG prevalence for cytomegalovirus was 86.8% in donors and 91.0% in kidney transplant recipients with statistical significance observed for age, geographical location, and between donors and recipients. We analyzed 1,764 pairs of donors and recipients, of which 91.4% were categorized as having intermediate risk.

Contribución de los autores:

Yazmín Rocío Arias-Murillo: consolidación y validación de la información, discusión de resultados

Karime Osorio-Arango: consolidación, validación y análisis epidemiológico de los datos

Jorge Alberto Cortés y Mauricio Beltrán: discusión de resultados

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

Conclusions: The results of this study showed high cytomegalovirus infection rates in Colombia. Given the risk, categorization of patients undergoing transplants, measures should be adopted by medical teams to minimize risks.

Key words: cytomegalovirus, prevalence, seroepidemiologic studies, serology, tissue donor, kidney transplantation.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2938>

El citomegalovirus pertenece a la familia Herpesviridae y es un virus ampliamente distribuido entre mamíferos; es de reacción específica para la especie y tiene un efecto citopático caracterizado por el aumento del tamaño celular con presencia de inclusiones citoplásmicas e intranucleares. Estos virus comparten la capacidad de permanecer latentes durante largos periodos: después de la infección primaria, entran en los monocitos y en las células precursoras hematopoyéticas y permanecen latentes, generalmente por el resto de su vida, al igual que los anticuerpos de tipo IgG (1).

Es posible que el citomegalovirus se reactive como una nueva infección o como infección recurrente, fenómeno que puede ocurrir en cualquier momento y suele ser más frecuente cuando existe un compromiso inmunitario provocado por otra enfermedad, como el sida o los carcinomas, o por el tratamiento con inmunosupresores con agentes quimioterapéuticos, o por el trasplante de órganos.

En el caso del trasplante renal, el virus puede ser agente causal de infección o de una enfermedad posterior al trasplante, ya sea por reactivación del propio virus latente o por introducción de un virus presente en el órgano del donante. Se le considera un agente patógeno importante en estos pacientes inmunocomprometidos y representa un riesgo que puede estar asociado con la pérdida o la alteración de la función del injerto o con la mortalidad del receptor del trasplante (2-4).

La presencia de anticuerpos en una población indica infecciones previas y varía entre países en desarrollo y países desarrollados, con tasas generalmente bajas en Norteamérica, Europa, y Australia, y tasas de seroprevalencia más altas en África y Asia, las cuales pueden llegar a 100 % en algunos países (5-9).

El objetivo del presente estudio fue describir la prevalencia de anticuerpos para citomegalovirus en donantes de órganos y receptores de trasplante renal en Colombia.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio descriptivo y retrospectivo sobre la seroprevalencia de la infección por citomegalovirus en donantes de órganos y receptores de trasplante renal. La fuente de información fueron los resultados de las pruebas de laboratorio (anticuerpos de tipo IgG e IgM) reportados al sistema nacional de información de la Red Nacional de Donación y Trasplante durante el periodo de 2010 a 2014 por las instituciones prestadoras de servicios de salud con programas habilitados de trasplante renal.

En el caso de los donantes, el reporte de anticuerpos IgG anti-citomegalovirus se hace en cumplimiento de lo establecido en la normatividad vigente, y en el caso de los receptores corresponde a los resultados reportados como producto del estudio previo al trasplante al que deben someterse los individuos que ingresan en la lista de espera para trasplante renal (10,11).

Las variables sociodemográficas incluidas en la caracterización correspondieron a la edad, el sexo, la regional emisora del reporte y el régimen de afiliación al Sistema General de Seguridad Social en Salud; las variables clínicas incluyeron el grupo sanguíneo y los resultados de las pruebas de anticuerpos IgM e IgG para citomegalovirus.

El análisis se efectuó en tres etapas con los paquetes estadísticos IBM SPSS, Statistics 22®, y Epi-Info 7, con licencia otorgada al Instituto Nacional de Salud.

Durante la etapa del análisis univariado, las variables cuantitativas se describieron mediante el cálculo de medidas de tendencia central y dispersión, y las cualitativas, mediante frecuencias absolutas y relativas. En la siguiente etapa se calculó la seroprevalencia general de IgM e IgG para citomegalovirus en donantes de órganos y receptores de trasplante renal, así

Correspondencia:

Yazmín Rocío Arias-Murillo, Subdirección Nacional de Trasplantes y Bancos de Sangre, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N°51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (0571) 220 0925
ariasmurillo@hotmail.com

Recibido: 14/07/15; aceptado: 03/05/16

como la prevalencia de IgG para citomegalovirus estratificada por sexo, por grupos de edad y por regional; asimismo, se evaluó la significación de las diferencias de prevalencia entre los grupos estudiados mediante la prueba de ji al cuadrado, para lo cual se consideró como significativo un valor de p menor de 0,05. Por último, se analizó el resultado de IgG para citomegalovirus de cada pareja de donante y receptor, con el fin de estratificar el riesgo, y se calculó la prevalencia para cada grupo.

Consideraciones éticas

Este es un estudio retrospectivo que utilizó información secundaria y no presentó ningún riesgo adicional; se utilizaron los datos de donantes y receptores ingresados en el sistema de información de la Red Nacional de Donación y Trasplante en cumplimiento de la normatividad vigente. Las muestras ya se habían recolectado y procesado antes del estudio. No se hizo ninguna intervención o modificación intencionada de variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos participantes, por lo tanto, el estudio se catalogó como una investigación sin riesgo según la clasificación establecida en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud. Se protegió la confidencialidad de la información según los lineamientos establecidos y la normatividad de la Red Nacional de Donación y Trasplante (10).

Resultados

Donantes

Se analizaron los datos de 1.813 donantes de órganos, de los cuales 70,0 % correspondió a hombres; la mediana de edad fue de 33 años, con un mínimo de un año y un máximo de 69. El mayor porcentaje de donantes se presentó durante el 2010 (23,4 %), 42,0 % de ellos en la regional número 2, la cual corresponde a Medellín; el 54,0 % se encontraba afiliado al régimen contributivo y 60,0 % pertenecía al grupo sanguíneo O (cuadro 1). Del total de donantes, 59,3 % fue de tipo totipotencial, 33,5 %, multiorgánico, y 7,2 %, de un solo órgano.

La prevalencia general de IgM para citomegalovirus en los donantes fue de 1,3 % y de 86,2 % para IgG. Al comparar las prevalencias de IgG para el virus no se encontraron diferencias significativas por sexo ni por régimen de afiliación, pero sí entre los menores de 18 y los mayores de 50 años en cuanto a la prevalencia, y entre la regional de Bucaramanga y las de Bogotá y Medellín (cuadro 2).

Trasplante renal

Se estudiaron 3.313 pacientes con trasplante renal, de los cuales 60,0 % correspondía a hombres, con una mediana de edad de 42,5 años (mínimo de un año y máximo de 76 años). El mayor porcentaje se presentó durante el 2010 (25,8 %); 32,1 % pertenecía a la regional 2, correspondiente a Medellín; 75,6 % se encontraba afiliado al régimen contributivo, y 55,5 % pertenecía al grupo sanguíneo O, Rh positivo (cuadro 1); 79,0 % era de raza mestiza y en 93,7 % de los casos el donante había fallecido.

La prevalencia de IgM para citomegalovirus durante el periodo de estudio fue de 3,3 % y, para IgG, de 91,0 %. Al comparar la prevalencia de IgG se encontraron diferencias significativas por sexo, así como entre los menores de 18 y los mayores de 30 años, y entre los pertenecientes a la regional de Bucaramanga y la de Cali; no se encontraron diferencias significativas en cuanto al régimen de afiliación a la seguridad social (cuadro 2).

Cuadro 1. Características generales de donantes y receptores de trasplante renal, Colombia, 2010-2014

Características	Donantes		Receptores de trasplante renal	
	n	%	n	%
Año				
2010	425	23,4	856	25,8
2011	372	20,5	783	23,6
2012	391	21,6	773	23,3
2013	306	16,9	491	14,8
2014	319	17,6	410	12,4
Sexo				
Femenino	544	30	1.315	40
Masculino	1.269	70	1.998	60
Grupos de edad (años)				
<18	193	10,7	183	7,6
18-29	586	32,4	400	16,7
30-49	609	33,7	984	41,1
>50	418	23,1	829	34,6
Regional				
Bogotá	532	29,3	1.023	30,9
Medellín	760	41,9	1.061	32,1
Cali	343	18,9	791	23,9
Bucaramanga	101	5,6	234	7,1
Barranquilla	5	0,3	80	2,4
Neiva	72	4	120	3,6
Régimen				
Contributivo	879	54	2.503	75,6
Subsidiado	447	27,3	804	24,3
Otros	302	18,6	5	0,1
Grupo sanguíneo				
O	406	64,96	526	58,38
A	167	26,72	279	30,97
B	44	7,04	77	8,55
AB	8	1,28	19	2,11

Cuadro 2. Prevalencia de IgG para citomegalovirus en donantes y receptores de trasplante renal, Colombia, 2010-2014

Factor	Donantes			Trasplantados renales		
	Positivo (%)	Negativo (%)	p	Positivo (%)	Negativo (%)	p
Sexo						
Femenino	472 (86,8)	72 (13,2)	0,24 (0,62)	1.214 (92,3)	101 (7,7)	4,40 (0,03)
Masculino	1.090 (85,9)	179 (14,1)		1.802 (90,2)	196 (9,8)	
Grupos de edad (años)						
<18	157 (81,3)	36 (18,7)	1	155 (84,7)	28 (15,3)	1
18-29	509 (86,9)	77 (13,1)	3,55 (0,05)	351 (87,7)	49 (12,3)	1,01 (0,31)
30-49	525 (86,2)	84 (13,8)	2,72 (0,09)	890 (90,4)	94 (10,6)	5,44 (0,01)
>50	366 (87,6)	52 (12,4)	4,13 (0,04)	761 (91,8)	68 (8,2)	8,79 (0,00)
Regional						
Bogotá	462 (86,8)	70 (13,2)	5,08 (0,02)	930 (90,9)	93 (9,1)	3,00 (0,08)
Medellín	668 (87,9)	92 (12,1)	7,26 (0,00)	956 (90,1)	105 (9,9)	1,75 (0,18)
Cali	292 (85,1)	51 (14,9)	2,71 (80,09)	742 (93,8)	49 (6,2)	11,14 (0,00)
Bucaramanga	79 (78,2)	22 (21,8)	1	204 (87,2)	30 (12,8)	1
Barranquilla	4 (80,0)	1 (20,0)	0,00 (0,92)	70 (87,5)	10 (12,5)	0,00 (0,94)
Neiva	57 (79,2)	15 (20,8)	0,02 (0,88)	110 (91,7)	10 (8,3)	1,59 (0,20)
Régimen						
Contributivo	751 (85,4)	128 (14,6)	0,00 (0,96)	2.270 (90,7)	233 (9,3)	3,57 (0,05)
Subsidiado	392 (87,7)	55 (12,3)	0,83 (0,36)	470 (88,0)	64 (12,0)	1
Otro	257 (85,1)	45 (14,9)	1	5 (100)	0	0,68 (0,40)

Los números en negrilla indican las diferencias estadísticamente significativas.

Se comparó la prevalencia de IgG entre donantes (91 %) y receptores de trasplante renal (86,2 %), y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Se analizaron 1.764 parejas de donante y receptor y de su respectivo estado serológico, y se encontró que 91,4 % de los receptores de trasplante de riñón se clasificaron como de riesgo intermedio y 7,3 % como de riesgo alto (cuadro 3).

Discusión

En este estudio se confirmó la alta prevalencia de la infección por citomegalovirus en donantes y receptores de trasplante renal en Colombia. Aunque se registraron diferencias entre los donantes y los receptores de trasplante, los grupos de edad y las regionales, estas fueron relativamente pequeñas y, en su conjunto, muestran que Colombia aún tiene tasas de infección por citomegalovirus equiparables a las de otros países en desarrollo (6). La prevalencia de citomegalovirus difiere entre regiones geográficas y está relacionada con el nivel de desarrollo de los países: la seroprevalencia es baja en países de Norteamérica, Europa y Australia, con tasas de prevalencia de 40 %, y alcanza tasas de 100 % en países de Asia y África (5-8).

En general, las características sociodemográficas de los donantes de este estudio fueron similares a las reportadas por la Red Nacional de Donación y Trasplante en sus informes anuales, en los cuales

Cuadro 3. Estado serológico y estratificación del riesgo de donantes (D) y receptores (R) de trasplante renal, Colombia, 2010-2014

Estratificación del riesgo	Estado serológico	n	%
Alto	D+/R-	128	7,3
Intermedio	D-/R+	180	10,2
	D+/R+	1.433	81,2
Bajo	D-/R-	23	1,3

el mayor porcentaje de donantes corresponde a hombres jóvenes, lo cual se relaciona directamente con las condiciones sociales y las causas de muerte de los donantes de órganos en el país (12-15).

El mayor número de donantes y receptores de trasplante renal se presentó en el 2010, año durante el cual la Red de Donación y Trasplante presentó su máxima actividad, con una tasa de donación de 10 donantes por cada millón de habitantes. La mayoría de donantes pertenecía al grupo sanguíneo O, lo cual obedece a que se trata del tipo predominante entre los donantes potenciales, los receptores en lista de espera y la población colombiana en general (14-16).

En algunos estudios llevados a cabo en Serbia, Alemania y República Checa se encontraron prevalencias de IgG para citomegalovirus de 99,0, 83,0 y 80,0 %, respectivamente, en pacientes sometidos a procesos de hemodiálisis (17-19). En un estudio

de la República de Croacia, se evidenció que 90,7 % de los pacientes sometidos a hemodiálisis había sido positivo para IgG de citomegalovirus, mientras que en la población de control este porcentaje fue de 81,9, con diferencias significativas que sugirieron que la hemodiálisis constituía un factor de riesgo para dicha positividad (20).

Los resultados en los donantes de este estudio indicaron que la prevalencia fue de 86,2 %, con diferencias entre zonas geográficas; los análisis correspondieron a la división por regionales que opera en Colombia para las actividades de donación y trasplante, según lo establecido en las resoluciones 2640 de 2005 y 3272 de 2011 del Ministerio de la Protección Social. Teniendo en cuenta este criterio geográfico, se encontró una menor seroprevalencia de IgG para citomegalovirus en la regional 4 (Bucaramanga), lo cual podría estar asociado a condiciones socioeconómicas; sin embargo, es necesario indicar que el número de individuos de esta regional es mucho menor que el de las regionales 2 (Medellín) y 1 (Bogotá), las cuales tuvieron la mayor representación entre la población estudiada, así como las cifras más altas de seroprevalencia.

Se determinó la edad como una variable asociada a una mayor prevalencia de anticuerpos IgG para citomegalovirus, tanto en donantes de órganos como en los receptores de trasplante renal, con una diferencia significativa entre menores de 18 años y mayores de 50, lo cual indica que a medida que aumentaba la edad se incrementaron los resultados positivos para anticuerpos anti-citomegalovirus, tal como se ha reportado en estudios en diferentes poblaciones (8,17-26), y que la mayoría de las infecciones ocurren durante la niñez, lo que explica que el riesgo de infección en los adultos de Colombia sea inferior a 10 %. La poca frecuencia de infección primaria en adultos es relevante para los pacientes con trasplante, pues estos derivan su riesgo de enfermedad casi exclusivamente de la presencia de infección previa en el individuo receptor o en el donante del órgano. En los donantes y receptores negativos, el riesgo de enfermedad por citomegalovirus es extremadamente bajo.

Una de las implicaciones de este estudio se relaciona con el riesgo de infección o su reactivación en los pacientes receptores del trasplante. El riesgo de infección o de enfermedad por citomegalovirus en receptores de trasplante está determinado por diversas características del

huésped, entre las cuales cabe mencionar las enfermedades concomitantes, la edad, los factores genéticos y los factores de alto impacto, como la inmunosupresión y el estado serológico del citomegalovirus determinado por la asociación entre la presencia de IgG en el donante y en el receptor, lo cual permite establecer categorías de riesgo alto, intermedio y bajo (4,27).

En estudios anteriores en Colombia, Correa, *et al.*, reportaron en 1989 tasas de prevalencia más bajas en donantes (81 %) y en receptores (89 %), con mayor prevalencia en los receptores de trasplante renal; de igual forma, reportaron 76 % de parejas positivas de donante y receptor (28). Los resultados del presente estudio evidenciaron porcentajes más altos (81,2 %), con una muestra mucho más representativa de individuos de diferentes zonas geográficas del país.

En la población estudiada, 91,4 % de los pacientes con trasplante de riñón tenían riesgo intermedio, mientras que 7,3 % eran de riesgo alto. Estos datos tienen repercusiones en la planeación de las estrategias de prevención de la reactivación, la infección o el desarrollo de la enfermedad entre los pacientes sometidos a trasplantes. Un estudio previo en Medellín encontró que la frecuencia de pacientes de bajo riesgo era de 0,8 %, de riesgo intermedio, 90,9 % y de alto riesgo, 8,2 % (29). Estos datos sugieren que la mayoría de los pacientes requieren una estrategia preventiva (profilaxis o una estrategia anticipativa), pues menos de 10 % se consideraría de bajo riesgo y no requeriría de ninguna estrategia preventiva (30,31). En los estudios de cinética viral se ha validado esta aproximación, y se ha demostrado que las tasas de replicación se acercan a 0 % en los grupos de bajo riesgo, fluctúan entre 40 y 60 % en los grupos de riesgo intermedio y son cercanas a 90 % en los de alto riesgo.

Una limitación importante de este estudio fue su carácter retrospectivo, ya que no se pudo determinar la conducta adoptada en el seguimiento de los individuos sometidos a trasplante. Sin embargo, considerando el comportamiento del citomegalovirus y la prevalencia determinada en la población, el panorama que se evidenció refleja el riesgo de infección o enfermedad en los pacientes con trasplante renal en Colombia y plantea la necesidad de implementar estrategias de prevención en el manejo de las personas sometidas a trasplantes para minimizar los riesgos de infección y de enfermedad por citomegalovirus.

Agradecimientos

Al Instituto Nacional de Salud, especialmente a la Dirección de Redes en Salud Pública, la Subdirección Nacional de Trasplantes y Bancos de Sangre, la Coordinación Nacional de Donación y Trasplantes, y a la Oficina de Tecnologías de la Información y la Comunicación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses con respecto a los resultados del presente estudio.

Financiación

Este estudio fue financiado por el Instituto Nacional de Salud, Dirección de Redes en Salud Pública.

Referencias

- Hansen SG, Powers CJ, Richards R, Ventura AB, Ford JC, Siess D, et al. Evasion of CD8+ T cells is critical for superinfection by cytomegalovirus. *Science*. 2010;328:102-6. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1185350>
- Schnitzler MA, Lowell JA, Hardinger KL, Boxerman SB, Bailey TC, Brennan DC. The association of cytomegalovirus sero-pairing with outcomes and costs following cadaveric renal transplantation prior to the introduction of oral ganciclovir CMV prophylaxis. *Am J Transplant*. 2003;3:445-51. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-6143.2003.00069.x>
- Arthurs SK, Eid AJ, Pedersen RA, Kremers WK, Cosio FG, Patel R, et al. Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation. *Clin Infect Dis*. 2008;46:840-6. <http://dx.doi.org/10.1086/528718>
- Bataille S, Moal V, Gaudart J, Indreies M, Purgus R, Dussol B, et al. Cytomegalovirus risk factors in renal transplantation with modern immunosuppression. *Transpl Infect Dis*. 2010;12:480-8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3062.2010.00533.x>
- Enders G, Daiminger A, Lindemann L, Knotek F, Bäder U, Exler S, et al. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in pregnant women, bone marrow donors and adolescents in Germany, 1996-2010. *Med Microbiol Immunol*. 2012;201:303-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-012-0232-7>
- Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol*. 2010;20:202-13. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.655>
- Lopo S, Vinagre E, Palminha P, Paixao MT, Nogueira P, Freitas MG. Seroprevalence to cytomegalovirus in the Portuguese population, 2002-2003. *Euro Surveill*. 2011;16:19896.
- Vilibic-Cavlek T, Ljubic-Sternak S, Ban M, Kolaric B, Sviben M, Mlinaric-Galinovic G. Seroprevalence of TORCH infections in women of childbearing age in Croatia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011;24:280-3. <http://dx.doi.org/10.3109/14767058.2010.485233>
- Adjei AA, Armah HB, Gbagbo F, Boamah I, Adu-Gyamfi C, Asare I. Seroprevalence of HHV-8, CMV and EBV among the general population in Ghana, West Africa. *BMC Infect Dis*. 2008;8:111. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-8-111>
- Ministerio de Salud y Protección Social. Decreto 2493 de 2004. Por el cual se reglamentan parcialmente las Leyes 9ª de 1979 y 73 de 1988, en relación con los componentes anatómicos. Diario Oficial No.45631. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia; 2004.
- Instituto Nacional de Salud. Documento técnico nacional. Comisión de Riñón. 6ª versión, 2014. Fecha de consulta: 10 de junio de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Marco%20Legal%20documentos%20tcnicos%20y%20estadistica%20red%20d/COMISION%20Ri%20n%20C3%91ON%20Version%20No%206%20-2014.pdf>
- Instituto Nacional de Salud. Informe red donación y trasplantes 2010. Fecha de consulta: mayo 10 del 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadisticas/Informe%20FinalRed%20D%20Tx%20-%202010.pdf>
- Instituto Nacional de Salud. Informe anual, Red de Donación y Trasplantes. Volumen 1, Bogotá, 2011. Fecha de consulta: 10 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadisticas/Informe%20Red%20Donacion%20y%20Trasplantes%20-%20Vol%201%202011.pdf>
- Instituto Nacional de Salud. Informe anual, Red de Donación y Trasplantes. Volumen 2, Bogotá, 2012. Fecha de consulta: 10 de mayo de 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadisticas/Informe_Red%20donacion%20y%20trasplantes%20Vol2_2012.pdf
- Instituto Nacional de Salud. Informe anual, Red de Donación y Trasplantes. Volumen 3, Bogotá, 2013. Fecha de consulta: 10 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadisticas/INFORME%20ANUAL%202013%20RED%20DE%20DONACION%20Y%20TRASPLANTES.%20Vol%2003.pdf>
- Beltrán M, Ayala M, Jara J. Frecuencia de grupos sanguíneos y factor Rh en donantes de sangre, Colombia, 1996. *Biomédica*. 1999;19:39-44. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v19i1.1006>
- Korcáková L, Kaslík J, Svobodová J, Kaslíková J, Bláha J, Sedláčková E, et al. CMV infection in patients with chronic renal failure and in those following transplantation. *Czech Med*. 1988;11:131-6.
- Sibrowski W, Kühnl P, Kalmar G, Albert S, Böhm BO, Doerr HW. Cytomegalovirus diagnosis in blood donors and risk patients. *Beitr Infusionsther*. 1990;26:37-9.
- Trkulic M, Jovanovic D, Ostojic G, Kovacevic Z, Taseski J. Cytomegalovirus infection in patients with kidney diseases. *Vojnosanit Pregl*. 2000;57:63-7.
- Vilibic T, Kolaric B, Ljubic S, Kos M, Kaic B, Mlinaric G. Prevalence and dynamics of cytomegalovirus infection among patients undergoing chronic hemodialysis. *Indian J Nephrol*. 2015;25:95-98. <http://dx.doi.org/10.4103/0971-4065.139488>

21. **Betjes MG, Litjens NH, Zietse R.** Seropositivity for cytomegalovirus in patients with end-stage renal disease is strongly associated with atherosclerotic disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22:3298-303. <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfm348>
22. **Kao TW, Hsu WA, Chen HS, Chen WY.** A two year follow-up study of common virus infections in hemodialysis patients in Taiwan. *Artif Organs.* 2002;26:879-83. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1525-1594.2002.07053.x>
23. **Jha V.** Post-transplant infections: An ounce of prevention. *Indian J Nephrol.* 2010;20:171-8. <http://dx.doi.org/10.4103/0971-4065.73431>
24. **Cordero E, Casasola C, Ecarma R, Danguilan R.** Cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients: Incidence, clinical profile, and risk factors. *Transplant Proc.* 2012;44:694-700. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.11.053>
25. **Cavdar C, Celtik A, Saglam F, Sifil A, Atila K, Celik A, et al.** Cytomegalovirus disease in renal transplant recipients: A single-center experience. *Ren Fail.* 2008;30:503-6. <http://dx.doi.org/10.1080/08860220802064705>
26. **Enan KA, El-Hussein AM, El Eragi A, Elkhider IM.** Seroreactivity to human cytomegalovirus in a cohort of Sudanese renal transplant patients. *Khartoum Med J.* 2009;2:197-9.
27. **Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, Degre M, Holter E, Foss A, et al.** A prospective study of the natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal allograft recipients. *Transplantation.* 2000;70:1166-74.
28. **Correa MR, Correa M, Arbeláez M, Builes M, Ossa J.** Prevalencia de infección por citomegalovirus en receptores y donantes de trasplante renal en Medellín para 1988-1989. *Acta Médica Colombiana.* 1990;15:175-9.
29. **Díaz J, Henao J, Rodelo J, García A, Arbeláez M, Jaimes F.** Incidence and risk factors for cytomegalovirus disease in a Colombian cohort of kidney transplant recipients. *Transplant Proc.* 2014;46:160-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.07.070>
30. **Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, et al.** Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation.* 2013;96:333-60. <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e31829df29d>
31. **Cortés JA, Yomayusa N, Arias YR, Arroyave IH, Cataño JC, García P, et al.** Consenso colombiano para la estratificación, diagnóstico, tratamiento y prevención de la infección por citomegalovirus en pacientes adultos con trasplante renal. *Infectio.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2015.10.005>

ARTÍCULO ORIGINAL

Prevalencia de la infección con el virus linfotrópico de células T humanas de tipo 1 y 2 en donantes de sangre en Colombia, 2001-2014: implicaciones sobre la seguridad de la transfusión

María Isabel Bermúdez-Forero, Maritza Berrío-Pérez, Andrea Magally Herrera-Hernández,
Magda Juliana Rodríguez-Rodríguez, Sandra García-Blanco,
Guillermo Orjuela-Falla, Mauricio Beltrán

Coordinación de la Red Nacional de Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión,
Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C., Colombia

Introducción. El virus linfotrópico de células T humanas (HTLV) de tipos 1 y 2 ocasiona trastornos clínicos asociados a enfermedades degenerativas y proliferativas. Entre sus principales mecanismos de transmisión está la transfusión, asociada principalmente al uso de componentes celulares como los glóbulos rojos.

Objetivo. Describir la epidemiología del HTLV 1 y 2 en donantes de sangre en Colombia, entre 2001 y 2014.

Materiales y métodos. Se hizo un análisis descriptivo y retrospectivo de la información enviada por la Red de Bancos de Sangre al Instituto Nacional de Salud sobre tamización, unidades reactivas y positividad para el HTLV 1 y 2 y sobre la estimación de riesgo de infección por la transfusión.

Resultados. Entre 2001 y 2014 se hizo en Colombia la tamización para la detección de anticuerpos de HTLV 1 y 2 de 60,2 % de la sangre captada, con una tasa acumulada de unidades reactivas de 0,3 %. Dicha tasa fue 20 veces superior en el departamento de Chocó (6,28 %), pese a que allí no se capta sangre desde el 2004. En el 2014, la tamización llegó a 94,9 %, con una positividad de 14,7 %. Con estos datos se pudo estimar que se transfundieron 406 unidades de glóbulos rojos potencialmente infecciosos, lo cual entrañaría una transmisión eficaz del virus a estos individuos. Pese a que no se le considera un departamento endémico, en Antioquia se registró la mayor proporción de pruebas positivas, con 215 unidades (53 %).

Conclusiones. Los resultados obtenidos sugieren que la infección por HTLV 1 y 2 se distribuye en varias zonas del país que no eran catalogadas como endémicas. Se ratificó la importancia de la tamización universal de las unidades de sangre captadas, para minimizar el riesgo de infección con este agente por la vía de la transfusión.

Palabras clave: virus 1 linfotrópico T humano, transfusión sanguínea, bancos de sangre, donantes de sangre, prevalencia, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2943>

Prevalence of human T-cell lymphotropic virus I and II in Colombian blood donors, 2001-2014: Implications for transfusion safety

Introduction: The human T-cell lymphotropic virus (HTLV) 1 and 2 cause various clinical disorders associated with degenerative diseases. Blood transfusion is a primary mechanism of transmission that is associated with the use of cellular components such as red blood cells.

Objective: To describe the epidemiology of HTLV 1 and 2 in blood donors in Colombia from 2001-2014.

Materials and methods: A retrospective analysis was performed using screening, reactivity and positivity for HTLV 1 and 2 data collected from 2001 to 2014 by Colombian blood banks and consolidated by the *Instituto Nacional de Salud*. Using this information, transfusion-associated infectivity was also estimated.

Results: From 2001 to 2014, 60.2% of blood collected in Colombia was screened for HTLV 1 and 2 and had a cumulative reactivity of 0.30%. This was 20 times higher in Chocó (6.28%), where blood collection

Contribución de los autores:

María Isabel Bermúdez-Forero: concepción y diseño, consolidación, análisis e interpretación de los datos

Maritza Berrío-Pérez: consolidación, análisis e interpretación de los datos

Andrea Magally Herrera-Hernández, Magda Juliana Rodríguez-Rodríguez, Sandra Milena García-Blanco: marco conceptual

Guillermo Orjuela-Falla y Mauricio Beltrán: marco conceptual y apoyo en el análisis de los datos

Todos los autores participaron en la revisión crítica del documento y en la escritura del manuscrito.

ended in 2004. Blood screening for HTLV reached 94.9% in 2014 with a positive concordance of 14.7%, and an estimated 406 unscreened, potentially infectious blood units were released. The majority of the unscreened blood units (215 units, 53%) came from Antioquia, a non-endemic department.

Conclusion: These results suggest that HTLV 1 and 2 infections are distributed in different areas of the country that were not previously classified as endemic. These findings support the importance of the universal screening of blood units to minimize the risk of infection through transfusion for this event.

Key words: Human T-lymphotropic virus 1, blood transfusion, blood banks, blood donors, prevalence, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2943>

El virus linfotrópico de células T humanas (HTLV) se transmite por vía vertical, sexual y parenteral, por lo que ha sido reportado en usuarios de drogas intravenosas y en pacientes transfundidos. Se ha encontrado que puede permanecer latente por periodos prolongados en zonas endémicas y grupos familiares (1). Los portadores del HTLV-1 pueden desarrollar enfermedades asociadas a la infección a lo largo de sus vidas, como la leucemia de células T del adulto (2-4 % de los infectados) y la paraparesia espástica tropical (1,5-3 % de los infectados) (1,2).

El HTLV-1 se ha estudiado ampliamente, pero a pesar de ello, aún no se tiene una cifra aproximada del número de individuos infectados en el mundo (3) y la mayoría de los datos de prevalencia provienen de estudios de donantes de sangre de bajo riesgo o en grupos no representativos seleccionados de la población general (4-7).

En un estudio publicado en 1996, se estimó que en el mundo había entre 15 y 20 millones de personas con el HTLV-1 (4); en Suramérica, la infección por el HTLV-1 se ha reportado en la mayoría de los países (3).

El HTLV-I fue detectado en Colombia en 1981 por Zaninovic, *et al.*, en una serie de pacientes provenientes de algunas poblaciones de la costa Pacífica que padecían de paraparesia espástica (8). El mismo grupo documentó sistemáticamente los reportes de caso y la prevalencia de la infección en otras regiones y grupos poblacionales del país, especialmente comunidades indígenas (9,10). En un estudio de una muestra de individuos

provenientes de una zona endémica (Tumaco, Nariño), se encontraron tasas de prevalencia de anticuerpos contra el HTLV-1 cercanas a 3 % (11).

En trabajos más recientes, se evidenció la dificultad del diagnóstico clínico, incluso en zonas consideradas de alta endemia (12). Debido a la lenta progresión de los síntomas y su asociación con otras alteraciones neurológicas, los casos de paraparesia representan un reto para el diagnóstico (4). Por otro lado, Carrascal, *et al.*, adelantaron un estudio enfocado en la detección del virus en posibles casos no diagnosticados de leucemia o linfoma de células T en una zona endémica, y encontraron que 5 de 75 pacientes con linfoma no Hodgkin eran positivos para la secuencia del HTLV-I mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (13).

En un estudio reciente en Colombia, se describieron dos casos clínicos de pacientes procedentes de una zona endémica que padecían de leucemia o linfoma de células T y que solo pudieron ser diagnosticados en un servicio de patología de alta complejidad (14).

Un amplio número de investigaciones se han enfocado en donantes voluntarios de sangre para aproximarse al estudio de la presencia del virus en una región determinada. Dada su capacidad de transmitirse por medio de la transfusión, la detección de la infección en donantes de sangre ha resultado de enorme impacto en salud pública (15).

La tasa de infectividad (*infectivity rate*) establecida a partir de unidades de sangre seropositivas varía, con un promedio cercano a 27 % (16), aunque en algunos reportes se sostiene que las tasas pueden oscilar entre 20 y 63 % (17). A pesar de que no se ha demostrado que la leucorreducción prevenga por completo la transmisión, algunos estudios evidencian que la mitiga en grados variables (18). Se estima que, en ausencia de la prueba de tamización o de la leucorreducción, el riesgo de transmisión sería de alrededor de dos a 63 por millón de habitantes en países desarrollados,

Correspondencia:

María Isabel Bermúdez-Forero, Coordinación Red Nacional de Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N° 51-20, Bogotá D.C., Colombia
Teléfono: (571) 221 2219 y 220 7700, extensión 1254 o 1255
mbermudez@ins.gov.co

Recibido: 13/07/15; aceptado: 03/05/16

donde la prevalencia de la infección oscila entre uno por 10.000 a uno por 100.000. Este riesgo se ha reducido mucho (más de 95 %) gracias a la introducción de la prueba serológica de tamización en donantes. El riesgo calculado para los Estados Unidos es de aproximadamente uno en tres millones de unidades (18,19).

Es importante resaltar que en Colombia el proceso de confirmación, notificación, asesoría y canalización de donantes de sangre positivos para los marcadores infecciosos relevantes comenzó a implementarse en los bancos de sangre con la expedición de la circular 082 de 2011 (20). A partir de febrero de 2014 las pruebas de detección del HTLV 1 y 2 son obligatorias para todos los donantes de sangre del país (21). Por esta razón, se planteó hacer un estudio retrospectivo de la información remitida a la red de bancos de sangre que permitiera describir la epidemiología del HTLV en donantes de sangre de Colombia desde 2001, año en el cual se inició la tamización para HTLV 1 y 2, hasta 2014, último año en el cual la tamización fue inferior a 100 %.

Materiales y métodos

Se hizo un análisis descriptivo retrospectivo con base en la información consolidada por la Red Nacional de Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión del Instituto Nacional de Salud desde 2001 y hasta 2014.

En los análisis de las variables cuantitativas se incluyeron las unidades de sangre obtenidas, las sometidas a tamización, las reactivas (es decir, con resultado positivo en la prueba de tamización) y las positivas (resultado confirmado mediante pruebas de inmunoblot).

Se asumió que las unidades no sometidas a tamización presentaban un comportamiento similar a las tamizadas con respecto al número de unidades reactivas y la proporción de casos positivos confirmados. Teniendo en cuenta que el proceso de confirmación sistemática de las unidades reactivas en los bancos de sangre se viene implementando desde mediados de 2012, pero que solo en el 2014 se logró la unificación y la depuración de los datos, se tomó como referencia el porcentaje de positividad obtenido para este último año en las estimaciones hechas en el periodo de estudio.

Se estimó el riesgo de infección discriminado por departamento y por año empleando para el cálculo una tasa de infección de 27 % en promedio para las unidades positivas confirmadas, según lo establecido en la literatura científica (22).

Para las estimaciones se consideró que solo se había transfundido un componente sanguíneo por cada unidad de sangre total recolectada.

Resultados

En el periodo comprendido entre 2001 y 2014, se captaron 8'478.364 unidades de sangre total en todo el país, de las cuales 60,2 % (5'105.159) se sometió a tamización para HTLV 1 y 2 y 0,3 % (15.480) resultaron reactivas.

La tamización pasó de 15,3 % en 2001 a 75,4 % en 2013, pese a que el escrutinio de este marcador solo se hizo obligatorio en 2014, cuando llegó a 94,9 %.

Los departamentos en los que se hizo tamización para HTLV de más de 90 % fueron Valle del Cauca, Nariño y Caldas. En el departamento del Chocó se hizo tamización en 19,3 % de las unidades de sangre obtenidas y 6,28 % de las unidades fueron reactivas, es decir, 20 veces superior al promedio nacional (0,30 %) durante el periodo estudiado, pese a que este departamento no capta sangre desde el 2004. En los departamentos de Córdoba, Cauca, Antioquia, Caldas, Casanare y Magdalena ese promedio fue entre 1,7 y 3,1 mayor que el nacional (cuadro 1).

Los departamentos que tamizaron menos de 10 % de las unidades obtenidas fueron Caquetá, La Guajira, Casanare y Sucre, a pesar de que estos dos últimos presentaron un promedio de unidades reactivas superior al promedio nacional (0,75 y 0,96 %, respectivamente).

Al agrupar los resultados de las unidades reactivas por regiones, el mayor porcentaje se observó en la región Pacífica (7,52 %), seguida de la Caribe (3,53 %), la Andina (3,08 %), la Orinoquia (1,27 %), y la Amazonia (0,20 %).

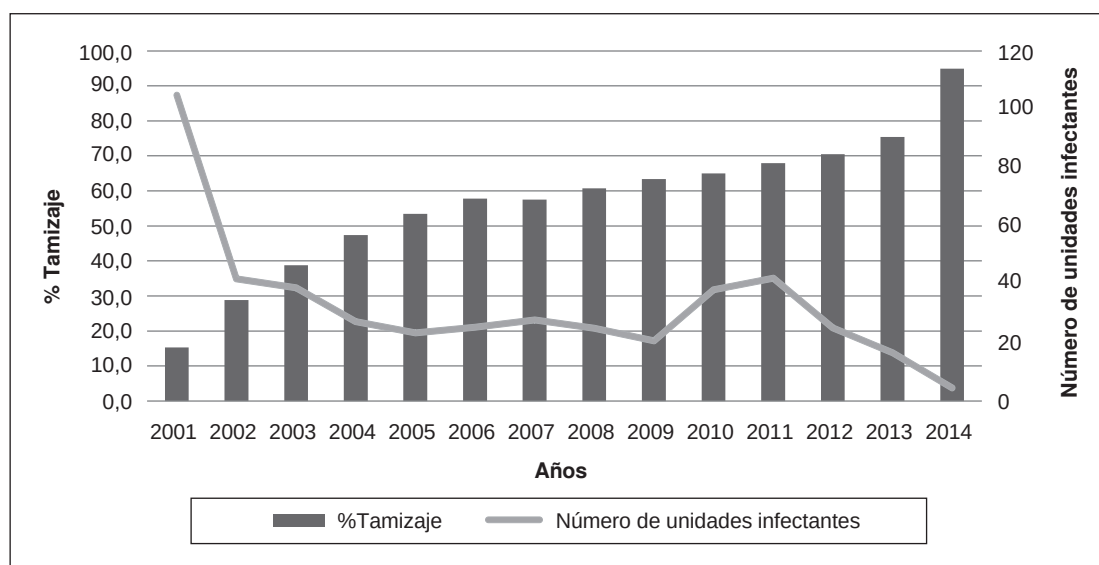
Al aplicar la misma proporción de unidades reactivas y de positividad de las unidades tamizadas, se calculó que 1.504 unidades de los 3'373.205 no tamizadas podrían haber sido positivas (0,045 %). Debido a la ausencia de una prueba de tamización universal para HTLV entre el 2001 y el 2014 en Colombia, se estimó que se transfundieron 406 unidades de glóbulos rojos empaquetados con capacidad de transmisión eficiente del virus HTLV 1 y 2 a los receptores (figura 1).

Al considerar el volumen de captación, el departamento que presentó el mayor riesgo de capacidad infecciosa fue Antioquia, en donde se calculó que 215 (53 %) unidades estaban infectadas, seguido de Atlántico, con 48 unidades (11,8 %) (cuadro 1).

Cuadro 1. Comportamiento de la tamización, las unidades reactivas y la probabilidad de infección del HTLV 1 y 2 por departamento, Colombia, 2001-2014

Departamento o distrito	Unidades de sangre obtenidas (2001 - 2014)	Unidades tamizadas (%)	Unidades reactivas (%)	Unidades positivas	Probabilidad de infección
Antioquia	1'296.386	23,1	0,54	797	215
Atlántico	426.332	13,2	0,33	178	48
Bogotá, D.C.	2'556.081	84,3	0,21	124	33
Bolívar	196.509	32,8	0,32	63	17
Boyacá	129.738	65,5	0,18	12	3
Caldas	210.553	93,7	0,57	11	3
Caquetá	35.084	2,8	0,20	10	3
Cauca	83.908	59,4	0,54	27	7
Cesar	171.233	71,2	0,47	34	9
Córdoba	206.247	51,9	0,50	73	20
Cundinamarca	224.443	86,1	0,37	17	5
Chocó	1.979	19,3	6,28	15	4
Huila	164.722	17,6	0,20	39	11
La Guajira	41.922	7,0	0,00	0	0
Magdalena	83.305	14,5	0,94	99	27
Meta	116.548	75,1	0,41	17	5
Nariño	114.457	98,4	0,35	1	0
Norte de Santander	167.649	16,8	0,28	57	15
Quindío	109.063	67,0	0,18	9	3
Risaralda	168.751	64,3	0,34	30	8
Santander	513.955	19,3	0,18	111	30
Sucre	91.350	4,8	0,96	123	33
Tolima	438.049	80,4	0,25	31	8
Valle del Cauca	859.654	99,8	0,35	1	0
Arauca	26.514	16,7	0,11	4	1
Casanare	30.903	8,7	0,75	31	8
Putumayo	9.154	0,0	--	--	--
Guainía	257	100,0	--	--	--
Guaviare	603	0,0	--	--	--
Vichada	2.945	0,0	--	--	--
Total nacional	8'478.364	60,2	0,30	1.503	406

-- No fue posible estimar el riesgo de infección por no contar con los datos de tamización o de unidades reactivas.

**Figura 1.** Comparación del comportamiento del porcentaje de tamización y el número estimado de unidades infecciosas liberadas, Colombia, 2001-2014

Con el incremento paulatino de la tamización se observó reducción de unidades potencialmente infectante, al pasar de 105 en 2001 a cinco unidades en 2014.

Los departamentos con menos unidades reactivas, los cuales aportaron 22,6 % de las unidades infecciosas que se habrían distribuido, fueron Arauca, Quindío, Boyacá, Huila, Caquetá, Bogotá, Santander y Tolima; en estos tres últimos, se captó 41,4 % de las unidades de sangre obtenidas en el periodo de estudio.

En Guainía, Guaviare, La Guajira, Putumayo y Vichada, no fue posible establecer el riesgo de infección porque ninguna de las unidades obtenidas fue tamizada o porque de las unidades tamizadas ninguna resultó reactiva durante el periodo analizado.

Discusión

Pese a que la distribución de las unidades reactivas para el HTLV pudo verse sesgada por el porcentaje de unidades de sangre tamizadas, se observó que, tal como lo describen los estudios poblacionales, en las regiones Pacífica y Caribe de Colombia se concentraron las unidades reactivas. Sin embargo, se registró una gran 'reactividad' en los departamentos que conforman la región Andina, aun cuando esta región no se considera endémica para este virus. Los cambios en la prevalencia de diversos agentes infecciosos en varias zonas del país podrían explicarse por la migración de la población.

Aunque el porcentaje de unidades reactivas fue el indicador inicial a partir del cual se estimó el riesgo de capacidad infecciosa, y la mayor 'reactividad' se registró en el Chocó, Antioquia aportó 53 % de las unidades potencialmente infecciosas (215/406) durante el periodo analizado, lo cual podría deberse al volumen de captación de este último departamento comparado con el registrado a nivel nacional (15,3 %).

Se observó un descenso en la prevalencia de donantes de sangre (0,09 %) comparado con los resultados del estudio en esta misma población publicado en 1999, el cual se llevó a cabo en bancos de sangre del país situados en zonas tanto endémicas como no endémicas, donde la prevalencia promedio fue de 0,45 % (23). La relación entre tamización y unidades reactivas presentó un comportamiento inversamente proporcional, lo cual puede atribuirse, entre otras razones, a una mejoría del proceso de selección de donantes o a una mayor especificidad de las pruebas de tamización.

Estos hallazgos demuestran la importancia de implementar la tamización universal para el HTLV 1 y 2, considerando la distribución de la 'reactividad' en el territorio nacional. Además, si se analizan los datos de departamentos como Antioquia en el contexto de su estatus de referente por el nivel de complejidad de su red hospitalaria, se hace más crítico el contar con el mayor número de estrategias que minimicen los riesgos para los pacientes que requieren transfusión.

Teniendo en cuenta que uno de los principales mecanismos de transmisión del HTLV 1 y 2 son las transfusiones, a partir de 2014 se estableció la obligatoriedad de la tamización del total de las unidades de sangre captadas, con lo que se espera reducir la transmisión y minimizar el riesgo de liberar unidades que puedan generar la infección. Asimismo, reviste especial importancia el hecho de que los bancos de sangre actualmente brindan asesoría a los donantes que resultan positivos, dado que la consejería médica a un portador asintomático es un reto enorme, sobre todo por el gran desconocimiento de la enfermedad entre el personal médico de atención primaria. Por ello, el contar con la información adecuada puede incentivar a esta población a acudir a sus servicios de salud de manera temprana y a implementar prácticas que minimicen la transmisión por las demás vías clásicas (materna y sexual).

Al comparar los resultados obtenidos en las pruebas de tamización durante los 13 años del periodo analizado, se pudo estimar una tasa de 303 unidades reactivas por cada 100.000 tamizadas, lo cual contrasta con el estudio de Carneiro, et al., en una población de donantes de primera vez en Brasil entre 2007 y 2009, en el cual se reportó una tasa de 135 unidades reactivas por 100.000 unidades tamizadas (24).

La tasa nacional de positividad calculada para el periodo de 2001 a 2014 (45 donaciones positivas por cada 100.000 efectuadas), contrasta con lo publicado para el periodo de 2000 a 2009 en donantes de primera vez en Estados Unidos, donde se halló una tasa de 5,1 por 100.000 unidades para el HTLV 1 y de 14,7 por 100.000 para el HTLV 2 (25).

Cuando se constata que la tasa calculada en Colombia es comparable con la de Brasil, país considerado endémico para el virus, cobra mayor relevancia la investigación poblacional (24).

Aunque el riesgo de producir infección de las 406 unidades de glóbulos rojos con potencial infeccioso dependía de diversas variables, un

número importante de pacientes podría desarrollar en el futuro las enfermedades que este virus provoca, para las cuales, como se sabe, no existen tratamientos curativos. Esto tendría un impacto considerable en el sistema de salud pública del país, debido a las implicaciones del tratamiento paliativo y los años de calidad de vida perdidos de los pacientes que las desarrollen. Aunque se ha encontrado que solo un porcentaje de los portadores asintomáticos llegan a desarrollar alguna de las enfermedades asociadas al virus, es importante considerar que estas no son de fácil diagnóstico y que en la actualidad no tienen cura, por lo que su tratamiento consiste en la administración de paliativos que procuran mantener la calidad de vida de los pacientes. Por consiguiente, si se busca minimizar la morbilidad asociada, es importante conocer la distribución endémica actual del virus, con el fin de orientar las estrategias de prevención que eviten al máximo su proliferación en la población colombiana.

Aunque los datos obtenidos en donantes de sangre representan un grupo de población preseleccionado, el cual se considera de bajo riesgo para infecciones transmisibles por vía parenteral, es posible extrapolar esta información para que constituya la línea de base de un eventual estudio sobre el comportamiento y la distribución regional del HTLV en la población general, en la cual la prevalencia podría ser superior.

Los resultados obtenidos evidenciaron la presencia del HTLV 1 y el 2 en diferentes zonas del país previamente catalogadas como no endémicas. Dada la importancia de este virus y a sus mecanismos de transmisión, los estudios poblacionales cobran relevancia para conocer su distribución actual en la población colombiana, y para contar con datos más precisos sobre la incidencia y la prevalencia de la infección por HTLV 1 y 2. Los resultados de tales estudios permitirían considerar su inclusión como una situación de interés en salud pública debido a las enfermedades que puede desencadenar en el paciente infectado.

Los resultados de este estudio ratifican la importancia de la tamización universal para el HTLV de las unidades de sangre captadas, con el fin de minimizar los riesgos de infección por la vía de la transfusión.

Agradecimientos

Al personal de los bancos de sangre y a las coordinaciones departamentales de la Red Nacional de Bancos de Sangre del país.

Financiación

Este trabajo se realizó con el apoyo financiero del Instituto Nacional de Salud.

Conflicto de intereses

Ninguno

Referencias

1. **Romaní F.** Revisión sistemática de estudios epidemiológicos sobre la infección por el virus linfotrópico de células T humanas I/II en el Perú. *Revista Peruana de Epidemiología*. 2010;14:1-9.
2. **Dow BC, Fiebig EW, Busch MP.** Retroviruses. En: Barbara JA, Regan FA, Contreras M, editors. *Transfusion Microbiology*. First edition. Cambridge: Cambridge University Press; 2008. p. 63.
3. **Villaverde JA, Romaní FR, Torres SM, Zunt JR.** Transmisión vertical de HTLV-1 en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2011;28:101-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1726-46342011000100016>
4. **Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL.** Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*. 2005;24:6058-68. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1208968>
5. **Hlela C, Shepperd S, Khumalo NP, Taylor GP.** The prevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1 in the general population in unknown. *AIDS Rev*. 2009;11:205-14.
6. **Gotuzzo E.** Risk of transfusion-transmitted human T-cell lymphotropic virus-type I in Latin America. *Int J Infect Dis*. 2000;4:59-61. [http://dx.doi.org/10.1016/S1201-9712\(00\)90094-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1201-9712(00)90094-8)
7. **Gotuzzo E, Verdonck K, González E, Cabada M.** Virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1): una infección endémica en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2004;21:253-60.
8. **Zaninovic V, Arango C, Biojó R, Mora C, Rodgers-Johnson P, Concha M, et al.** Tropical spastic paraparesis in Colombia. *Ann Neurol*. 1988;23(Supl.1):127-32.
9. **Zamora T, Zaninovic V, Kajiwara M, Komoda H, Hayami M, Tajima K.** Antibody to HTLV-I in indigenous inhabitants of the Andes and Amazon regions in Colombia. *Jpn J Cancer Res*. 1990;81:715-9.
10. **Zaninovic V, Moreno D.** A propósito de cinco casos de paraparesia espástica tropical en Puerto Tejada (Cauca). *Colombia Médica*. 1997;28:67-70.
11. **Trujillo J, Concha M, Muñoz A, Bergonzoli G, Mora C, Borrero I.** Seroprevalence and cofactors of HTLV-I infection in Tumaco, Colombia. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1992;8:651-7. <http://dx.doi.org/10.1089/aid.1992.8.651>
12. **Rosero F, Aguirre C, Rosero M, Orjuela DL, Rosero A.** Paraparesia espástica tropical en un paciente con HTLV-I. *Neurología Argentina*. 2011;3:229-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuarg.2011.04.003>
13. **Carrascal E, Cortés A, Akiba S, Tamayo O, Quiñónez F.** Epidemiología y patología de la leucemia/linfoma de las células T del adulto en Cali y el suroccidente colombiano. *Colombia Médica*. 2004;35:12-7.

14. **Medina EA, Orduz R, Morales OL, Martínez Ó, Baldión M, Isaza MA.** Leucemia/linfoma T del adulto en pacientes infectados con HTLV-1: reporte de dos casos de Colombia. *Biomédica*. 2013;33:519-25. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i4.1429>
15. **Di Lorenzo-Oliveira C, Loureiro F, De Bastos MR, Proietti FA, Carneiro-Proietti AB.** Blood donor deferral in Minas Gerais State, Brazil: Blood centers as sentinels of urban population health. *Transfusion*. 2009;49:851-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.02062.x>
16. **Whyte G.** Is screening of Australian blood donors for HTLV-I necessary? *Med J Aust*. 1997;166:478-81.
17. **Vrielink H, Reesink H.** HTLV-I/II prevalence in different geographic locations. *Transfus Med Rev*. 2004;18:46-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmr.2003.10.004>
18. **Hewitt PE, Davison K, Howell DR, Taylor GP.** Human T-lymphotropic virus lookback in NHS Blood and Transplant (England) reveals the efficacy of leukoreduction. *Transfusion*. 2013;53:2168-75. <http://dx.doi.org/10.1111/trf.12105>
19. **Pomper G, Wu Y, Snyder E.** Risks of transfusion-transmitted infections: 2003. *Curr Opin Hematol*. 2003;10:412-8.
20. **Instituto Nacional de Salud.** Circular No. 0082 de 2011. Pruebas confirmatorias de donantes de sangre serorreactivos. Fecha de consulta: 23 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Normatividad%20Red%20nal%20bancos%20de%20sangre/Circular%200082%20de%202011.pdf>.
21. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Resolución 437 de 2014. Fecha de consulta: 23 de mayo de 2015. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%200437%20de%202014.pdf
22. **Manns A, Wilks RJ, Murphy EL, Haynes G, Figueroa JP, Barnett M, et al.** A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int J Cancer*. 1992;51:886-91.
23. **Cortés A, Beltrán M, Gallego GA, Isaza LM.** Estudio prospectivo seroepidemiológico de infección por el virus linfotrópico humano I y II (HTLV-I/II) en donantes de sangre de áreas colombianas endémicas y no endémicas. *Colombia Médica*. 1999;30:19-25.
24. **Carneiro-Proietti AB, Sabino EC, Leão S, Salles NA, Loureiro P, Sarr M, et al.** Human T-lymphotropic virus type 1 and type 2 seroprevalence, incidence, and residual transfusion risk among blood donors in Brazil during 2007–2009. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28:1265-72. <http://doi.org/10.1089/aid.2011.0143>
25. **Chang YB, Kaidarova Z, Hindes D, Bravo M, Kiely N, Kamel H, et al.** Seroprevalence and demographic determinants of human T-lymphotropic virus Type 1 and 2 infections among first-time blood donors-United States, 2000-2009. *J Infect Dis*. 2014;209:523-31. <http://doi.org/10.1093/infdis/jit497>

ARTÍCULO ORIGINAL

Descarga de HSV-1, HSV-2, CMV y EBV en la saliva de receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos de la Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia, Bogotá, D. C.

Sonia P. Bohórquez¹, Juliana Díaz¹, Claudia M. Rincón¹, Marcela Estupiñán², Mauricio Chaparro², Ana María Low-Calle³, Jaime E. Castellanos^{1,3}

¹ Grupo de Investigación en Patogénesis Infecciosa, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

² Unidad de Trasplante, Fundación HOMI – Hospital de la Misericordia, Bogotá, D.C., Colombia

³ Grupo de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El trasplante de precursores hematopoyéticos es una alternativa en el tratamiento de diversas condiciones en la población pediátrica. La intensidad del acondicionamiento para el trasplante predispone al desarrollo de complicaciones en los receptores. Las infecciones por el virus herpes simple 1 (HSV-1), el virus herpes simple 2 (HSV-2), el citomegalovirus (CMV) humano y el virus de Epstein-Barr (EBV) son una causa importante de morbilidad y mortalidad en estos pacientes. La reactivación de infecciones latentes puede producir descargas virales asintomáticas detectables en la saliva, lo cual ayuda a determinar el comportamiento de dichas infecciones en pacientes con trasplante y a establecer el diagnóstico temprano de la reactivación.

Objetivo. Evaluar el comportamiento de la descarga viral de HSV-1, HSV-2, CMV y EBV en la saliva de pacientes hospitalizados en la Unidad de Trasplante de la Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia, entre enero y noviembre de 2012.

Materiales y métodos. Se evaluaron muestras de saliva de 17 receptores de trasplante. La presencia de ADN de HSV-1, HSV-2, CMV y EBV en las muestras de saliva se detectó mediante reacción en cadena de la polimerasa convencional.

Resultados. Se detectó el ADN del HSV-2 en la saliva de cuatro pacientes, del CMV en la de cuatro y del EBV en la de nueve, lo cual se asoció con leucopenia. Cuatro de los 17 pacientes presentaron cargas simultáneas de CMV y EBV. No se detectó el ADN del HSV-1.

Conclusiones: Se demostró una descarga asintomática de HSV-2, CMV y EBV asociada a leucopenia en la saliva de los pacientes.

Palabras clave: Herpesviridae, simplexvirus, herpes simple, citomegalovirus, herpesvirus humano 4, trasplante de médula ósea, trasplante de células madre hematopoyéticas.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2985>

Shedding of HSV-1, HSV-2, CMV, and EBV in the saliva of hematopoietic stem cell transplant recipients at Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia, Bogotá, D.C.

Introduction: Hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients is an alternative treatment for different diseases. The conditioning regimen for transplant predisposes recipients to the development of infections. Viral infections by herpes simplex virus 1 (HSV-1), herpes simplex virus 2 (HSV-2), human cytomegalovirus (CMV), and Epstein-Barr virus (EBV), are the most common, and the leading cause of morbidity and mortality among these patients. These viruses lie dormant in various cell types and the reactivation of latent infections may lead to asymptomatic viral shedding in saliva. The detection of these viruses in secretions may contribute to understand the behavioral dynamics of these viral infections in transplanted patients, and to the early diagnosis of reactivation.

Objective: To assess HSV-1, HSV-2, CMV and EBV viral shedding in the saliva of patients admitted for hematopoietic stem cell transplantation at Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia between January and November of 2012.

Contribución de los autores:

Sonia P. Bohórquez: elaboración del proyecto, revisión de la literatura, recolección de las muestras, análisis de los resultados y escritura del manuscrito

Juliana Díaz y Claudia M. Rincón: recolección y procesamiento de las muestras, análisis de los resultados y escritura del manuscrito

Marcela Estupiñán y Mauricio Chaparro: elaboración del proyecto y análisis de resultados

Ana María Low-Calle: procesamiento de las muestras

Jaime E. Castellanos: elaboración del proyecto, procesamiento de las muestras, análisis de los resultados y escritura del manuscrito

Materials and methods: We evaluated stimulated saliva samples of 17 hematopoietic stem cell transplantation recipients weekly. We performed DNA extraction from saliva, and we evaluated the presence of DNA for HSV-1, HSV-2, CMV, and EBV by PCR.

Results: While we detected HSV-2 and CMV DNA in the saliva of four patients, EBV DNA was detected in nine patients with leukopenia. In contrast, we did not detect HSV-1 DNA in saliva. Additionally, four out of the 17 patients showed a simultaneous shedding of CMV and EBV.

Conclusions: By conventional PCR, we demonstrated asymptomatic HSV-2, CMV, and EBV viral shedding in saliva, associated with leukopenia.

Key words: Herpesviridae, simplexvirus, herpes simplex, cytomegalovirus, herpesvirus 4, bone marrow transplantation, hematopoietic stem cell transplantation.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2985>

Los virus herpes son los principales agentes patógenos en la cavidad oral de los seres humanos (1,2). La familia Herpesviridae se agrupa en tres subfamilias: la alfa, que incluye el virus herpes simple 1 (HSV-1), el virus herpes simple 2 (HSV-2) y el virus varicela zóster (VZV); la beta, que incluye el citomegalovirus (CMV) humano, el virus herpes humano 6 (HSV-6) y 7 (HSV-7), y la gamma, que incluye el virus de Epstein-Barr (EBV) y el HSV-8 (3).

Además de producir infecciones líticas, una de las principales características de los virus herpes es su capacidad de latencia debida al equilibrio entre el virus y el sistema inmunológico del huésped, con su consecuente persistencia asintomática. El ADN latente puede desencadenar la reactivación y el ensamblaje de los virus y dar lugar a síntomas o no, aunque facilita la transmisión en huéspedes seronegativos (4-7).

Dicha transmisión ocurre principalmente por contacto directo o próximo con individuos sintomáticos, pero se ha demostrado la presencia temporal de partículas virales en las secreciones de individuos infectados que no manifiestan signos ni síntomas; a esto se le ha denominado descarga o eliminación (*shedding*) viral asintomática, la cual puede detectarse en saliva, orina, leche materna, lágrimas y semen. Las descargas de HSV-1, HSV-2, CMV y EBV están bien documentadas en individuos inmunocompetentes, sometidos a tratamientos odontológicos e inmunosuprimidos (8-15).

El acondicionamiento previo al trasplante de precursores hematopoyéticos produce una considerable inmunosupresión y, consecuentemente,

eleva la morbimortalidad después del trasplante, principalmente en los receptores de trasplantes alogénicos. La recuperación del sistema inmunológico después de un trasplante de precursores hematopoyéticos es gradual, con una fase inicial de reducción inmunológica inmediatamente después del trasplante, hasta la recuperación de los neutrófilos. La segunda fase va desde el momento del injerto en la médula ósea hasta el tercer o cuarto mes, y el efecto más importante se produce en la inmunidad mediada por células (16).

Hasta hace algunos años, las infecciones y reactivaciones por HSV-1 y HSV-2 frecuentemente aumentaban la morbimortalidad en los pacientes con trasplante, y el riesgo de complicaciones se incrementaba debido a la mucositis gastrointestinal, por lo cual, desde la década de los 80, se administra a todos los pacientes una profilaxis antiviral con aciclovir (11).

La infección y reactivación por CMV continúa siendo uno de los problemas más importantes para los receptores de trasplantes. Esto ha impuesto la necesidad de desarrollar protocolos para el diagnóstico temprano mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la detección de la antigenemia, y para la profilaxis y el tratamiento anticipado con ganciclovir (16).

Se ha detectado la descarga asintomática de CMV en la saliva de receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos. Correia-Silva, *et al.*, evaluaron la descarga oral de CMV en receptores de trasplante alogénico y concluyeron que la detección del virus en la saliva puede contribuir a un diagnóstico temprano de su reactivación o infección en este grupo de pacientes (17).

El EBV es uno de los virus más comunes en los seres humanos; la mayoría de las infecciones es asintomática, pero debe destacarse su asociación con neoplasias malignas, como el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo, entre otras.

Correspondencia:

Sonia del Pilar Bohórquez, Facultad de Odontología,
Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 N° 45-03,
edificio 210, oficina 301, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 316 5000, extensión 16017
spbohorqueza@unal.edu.co

Recibido: 21/07/15; aceptado: 19/05/16

En los receptores de trasplante se ha asociado con el síndrome linfoproliferativo postrasplante (18,19).

Debido a la inmunosupresión causada por el acondicionamiento previo al trasplante, el equilibrio entre el sistema inmunológico y los virus herpes en latencia se puede alterar, propiciando su reactivación. Igualmente, si el paciente es seronegativo y adquiere la infección durante el periodo de inmunosupresión (principalmente el CMV), pueden presentarse complicaciones que lleven al fracaso del trasplante. La detección de estas reactivaciones e infecciones antes del inicio de los síntomas es importante en la prevención y el control de tales complicaciones.

Dado que estos cuatro virus herpes pueden detectarse en la saliva, en este estudio se propuso evaluar la descarga de HSV-1, HSV-2, CMV y EBV en la saliva de receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos de la Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia.

Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio observacional de tipo longitudinal para evaluar la descarga de HSV-1, HSV-2, CMV y EBV en la saliva de los pacientes que ingresaron a la Unidad de Trasplante de Precusores Hematopoyéticos en la Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia, en el período comprendido entre enero y noviembre de 2012. Se excluyeron los pacientes cuyos padres o acudientes no aceptaron participar y aquellos de quienes no se pudo obtener una muestra adecuada de saliva después de dos intentos.

Se obtuvo información de la historia clínica sobre el recuento de leucocitos en el momento de la toma de muestras de saliva, la detección de anticuerpos específicos para alguno de los virus evaluados y la antigenemia o el resultado de la PCR para detectar la reactivación de CMV. El valor de referencia normal de leucocitos en sangre en esta institución fluctúa entre 4.500 y 13.500 células/ μ l.

Recolección de muestras

Se recolectaron muestras semanales de saliva de cada paciente a partir del momento de la hospitalización en la unidad de trasplantes y durante la permanencia en esta, hasta tres meses máximo. Se estimuló la secreción de saliva solicitando al paciente que masticara un trozo de cera para base de uso odontológico y luego se recolectó la saliva en un tubo estéril de 50 ml que contenía 500 μ l de

medio de transporte DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium), 100 UI/ml de penicilina y 10 μ g/ml de estreptomicina. Las muestras se refrigeraron a 4 °C y se transportaron al laboratorio para su procesamiento.

Procesamiento de muestras

Una vez en el laboratorio, bajo condiciones de asepsia y en cabina de flujo laminar, las muestras se diluyeron en proporción de uno a uno en PBS, y se centrifugaron a 5.000 rpm o 3.186 RCF durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se hizo en 50 μ l de cada muestra. Se agregaron 150 μ l de la siguiente solución: resina Chelex 100 al 20 % en 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM de EDTA, y azida de sodio al 0,1 %. Esta mezcla se agitó en un agitador de tipo vórtex durante 10 segundos y se incubó a 56 °C durante 20 minutos. Después de otros 10 segundos de agitación en el agitador vórtex, la mezcla se incubó a 100 °C durante 10 minutos y, posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Tras observar un completo asentamiento de la resina, se recolectó el sobrenadante en un tubo nuevo y se almacenó a -20 °C hasta su uso (20).

En el cuadro 1 se presentan las condiciones de amplificación mediante PCR del ADN de HSV-1, HSV-2, CMV y EBV. Se decidió llevar a cabo la amplificación mediante PCR por separado para HSV-1 y HSV-2 primero, y después para CMV y EBV.

Para detectar el ADN de HSV-1 y HSV-2 mediante una PCR anidada, se siguió el protocolo descrito por Sun, *et al.* (21), usando un par de iniciadores externos (TO1 y TO2) y haciendo una nueva amplificación con tres iniciadores (TIA, TIB1 y TIB2), lo cual da como resultado un amplicón de 129 pb si está presente el HSV-1 (TIA + TIB1) y un amplicón de 163 pb si está presente el HSV-2 (TIA + TIB2). Como control positivo se utilizó el sobrenadante de células Vero infectadas con HSV-1 y HSV-2.

Las secuencias de los iniciadores para la detección del ADN de CMV amplifican un fragmento de 242 pb, el cual codifica para la proteína estructural UL56. Como control positivo se usaron células mononucleares de sangre periférica de un paciente con infección confirmada por CMV (22).

Cuadro 1. Especificaciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para cada virus

	HSV-1	HSV-2	CMV	EBV
	PCR anidada	PCR anidada	PCR convencional	PCR convencional
Gen blanco	ADN polimerasa viral	ADN polimerasa viral	UL56	ADN polimerasa viral
Iniciadores	Primera ronda, iniciador sentido TO1 (5'-GGC CAG CAG ATC CGC GTC TT-3'), Iniciador antisentido TO2 (5'-GCT GGG GTA CAG GCT GGC AA -3') Segunda ronda, iniciador sentido TIA (5'-CTG CCG GAC ACC CAG GGG CG-3') Iniciador antisentido TIB1 (5'-CCC GCC CTC CTC GCG TTC GT-3') Iniciador antisentido TIB2 (5'-CGA CCT CCT CGC GCT CGT CC-3')		Iniciador sentido (5'-ACG TGT TAC TGG CGG AGTCG-3') 0,5 mM, iniciador antisentido (5'-TTGAGTGTGGCCAGACTGAG -3')	(ACTCGTGACAGTGCTT CTTTAC)
Protocolo de amplificación	Temperatura inicial de 95 °C durante tres minutos; 25 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, a 65 °C durante 30 segundos, a 72 °C durante 45 segundos; extensión final a 72 °C durante 10 minutos y enfriamiento a 4 °C		Temperatura inicial de 95 °C durante tres minutos; 45 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, a 54 °C durante 30 segundos, a 72 °C durante 30 segundos; extensión final a 72 °C durante 7 minutos y enfriamiento a 4 °C	Temperatura inicial de 94 °C durante 2 minutos 39 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 60 °C y 45 segundos a 72 °C; para finalizar, 10 minutos a 72 °C
Control positivo	Sobrenadantes de células Vero infectadas con HSV-1	Sobrenadantes de células Vero infectadas con HSV-2	Células mononucleares de sangre periférica de un paciente con infección confirmada por CMV	Células TK6
Referencia	21	21	22	23

Para la detección del EBV se empleó el protocolo reportado por Sahin, *et al.*, con el cual se amplifica un producto de 176 pb (23). El control positivo consistió en ADN de células TK6, las cuales, como se sabe, son positivas para este virus.

En todos los casos, los productos de la reacción de cada muestra se separaron en una electroforesis de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio para su visualización y fotografía.

Consideraciones éticas

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia y por la Gerencia Científica de la Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia.

Resultados

En el periodo comprendido entre enero y noviembre de 2012, se hospitalizaron 18 pacientes en la Unidad de Trasplante de Precursores Hematopoyéticos de la Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia; uno de ellos se excluyó del estudio porque en dos ocasiones las muestras fueron insuficientes para el procesamiento. En total, se recolectaron y procesaron 105 muestras de saliva de los 17 pacientes incluidos en el estudio: entre 3 y 13 muestras por paciente, dependiendo del periodo de hospitalización.

Nueve de los pacientes eran de sexo femenino (52,9 %); la edad fluctuó entre los 3 y los 17 años (mediana de 9 años y promedio de 10,1 años), y la mayoría estaba en el rango de 7 a 15 años (cuadro 2).

En cuanto a los diagnósticos en el momento de la hospitalización, la distribución fue la siguiente: siete (41,1 %) pacientes tenían leucemia linfóide aguda; seis (35,3 %), leucemia mieloide aguda; dos (12 %), linfoma de Hodgkin; uno (5,8 %), anemia aplásica idiopática, y otro (5,8 %), neuroblastoma.

De los 17 pacientes, nueve (52,9 %) recibieron trasplante alogénico de cordón umbilical, cinco (29,4 %), trasplante alogénico de donante idéntico emparentado, y tres (17,7 %), trasplante autólogo (cuadro 2).

Mediante PCR se estableció que había descarga viral en las muestras de diez (58,9 %) de los 17 pacientes evaluados. En cuatro (23,5 %) de ellos se detectó descarga de HSV-2; en cuatro (23,5 %), de CMV, y en nueve (52,9 %), de EBV. En ninguna de las muestras se detectó el HSV-1 (cuadro 3). En la figura 1 se muestran los hallazgos en la electroforesis en gel de agarosa.

Los cuatro pacientes con descarga positiva para CMV también presentaban EBV; otros tres presentaban EBV y HSV-2 simultáneamente,

y el paciente 5 presentó los tres virus, pero no de forma simultánea. Todas las descargas eran asintomáticas; en el momento de la toma de las muestras, ningún paciente presentaba lesiones en la mucosa oral similares a las causadas por el virus del herpes.

Como se muestra en el cuadro 3, en 51 (48,6 %) de las 105 muestras de saliva se detectó, al menos, uno de los virus evaluados: 29 (27,6 %) fueron positivas para EBV, 12 (11,4 %), para CMV, y 10 (9,5 %), para HSV-2.

En la muestra número 12, el recuento leucocitario de la paciente 2 fue de 2.700/ μ l; se encontraron hemoblastos leucémicos en sangre periférica y se diagnosticó una recaída de la leucemia. Al paciente 5 se le diagnosticó el síndrome linfoproliferativo postrasplante después de la semana 12.

En el cuadro 3 se muestra el conteo de leucocitos, además de los resultados de cada muestra de saliva positiva en la respectiva semana. En algunos casos

se registraron datos sobre el recuento leucocitario porque no hubo información disponible en el día de la toma de la muestra.

Discusión

Las descargas virales asintomáticas son un importante medio de transmisión del virus del herpes, y la saliva es una de las secreciones que más se ha estudiado, principalmente en la detección de HSV-1; se ha comprobado la descarga de HSV-2, CMV y EBV (8,12,14). Igualmente, se ha demostrado que estas descargas tienen un comportamiento dinámico y variable, lo cual significa que no siguen un patrón uniforme y que pueden presentarse en distintos momentos del día. En individuos positivos para HIV, se ha observado esta variabilidad en la descarga de HSV-1 y HSV-2 en hisopados de la cavidad oral a distintas horas y durante periodos de hasta 30 días (10).

En el cuadro 3 se presenta este comportamiento en los pacientes con descargas virales. En el caso del HSV-2, solo el paciente 2 presentó más de una

Cuadro 2. Distribución de los pacientes por edad, sexo, diagnóstico, tipo de trasplante, serología y estatus para CMV

Paciente	Edad	Sexo	Diagnóstico	Tipo de trasplante	Serología	CMV
1	12	M	Linfoma de Hodgkin	Autólogo	ND	PCR negativa al egreso
2	16	F	LMA	TACU	HSV-1: IgG (+), IgM (-) HSV-2: IgG (-), IgM (-) EBV: IgG (-), IgM (-)	CMV IgG (-) Donante negativo
3	6	M	LLA	TACU	ND	Donante IgG (+) Antigenemia (+) en la semana 7
4	17	M	LLA	TADI	ND	ND
5	16	M	LLA	TACU	ND	Donante IgG (+); PCR positiva en la semana 12
6	9	F	LLA	TACU	ND	Antigenemia (+) en la semana 7
7	4	F	LLA	TACU	HSV-1: IgG (-), IgM (-) HSV-2: IgG (-), IgM (-)	Antigenemia (+) en la semana 7
8	10	F	Anemia aplásica adquirida	TADI	ND	ND
9	9	F	LMA	TACU	ND	ND
10	5	M	Neuroblastoma de alto riesgo	Autólogo	ND	ND
11	16	M	Linfoma de Hodgkin en recaída	Autólogo	ND	ND
12	7	F	LMA	TADI	HSV-1: IgG (+), IgM (-) HSV-2: IgG (-), IgM (-) EBV: IgG (+), IgM (-)	IgG (+), IgM (-)
13	7	F	LLA	TACU		IgG (+), IgM (+) PCR negativa al ingreso y en las semanas 3, 4 y 5
14	13	F	LMA	TADI	ND	ND
15	8	M	LLA	TACU	ND	ND
16	14	M	LMA	TACU	ND	ND
17	3	F	LMA	TADI	ND	ND

LMA: leucemia mieloide aguda; LLA: leucemia linfóide aguda; TACU: trasplante alogénico de cordón umbilical; TADI: trasplante alogénico de donante idéntico; ND: sin datos; PCR: reacción en cadena de la polimerasa

Cuadro 3. Pacientes con descargas virales positivas por semana y recuento leucocitario por μ l en el día de toma de la muestra

Paciente	Semana											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	EBV 4200	EBV 3980	EBV 40	EBV 300	EBV 1000							
2				HSV-2 0		HSV-2 340	HSV-2 EBV 720	HSV-2 EBV 1080	HSV-2 EBV 320	HSV-2 73	HSV-2 EBV 2700	
3	EBV 2500	CMV 2200	CMV 0		EBV 250	EBV 810						
5	CMV EBV 3400	HSV-2 EBV 3670						EBV 40	EBV 70	EBV 60		EBV 10
6	CMV EBV 4830		CMV 20	CMV 270	CMV	CMV EBV 290	CMV EBV 110	CMV EBV				
7				CMV 80			CMV EBV 1690					
8			EBV 110	EBV 3000								
11	HSV-2 EBV 6030	EBV 3694		EBV 7680								
13		HSV-2 40										
17			EBV 330									

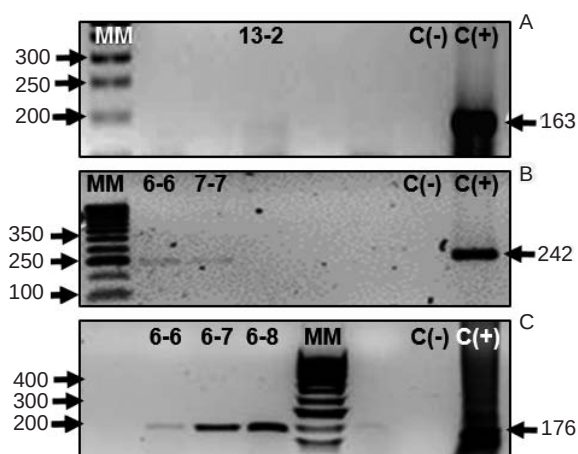


Figura 1. A. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación de 163 pb para la ADN polimerasa del HSV-2. Paciente 13, muestra 2 positiva. **B.** Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación de 242 pb para el gen *UL56* del CMV. Paciente 6, muestras 6 y 7 positivas. **C.** Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación de 176 pb para el gen de la ADN polimerasa del EBV. Paciente 6, muestras 6, 7 y 8 positivas.

muestra positiva, en la semana 4 y a partir de la semana 6 en todas las muestras; en los otros tres pacientes, sola una muestra fue positiva. En cuanto a las descargas del virus de Epstein-Barr,

los nueve positivos presentaron más de una descarga, excepto los pacientes 7 y 17, en quienes se detectó en una sola oportunidad. Se observó un comportamiento semejante para las descargas de CMV, y el paciente 5 tuvo una muestra positiva.

Las descargas de HSV-1 en saliva se han estudiado con mucha mayor frecuencia que las de HSV-2; usualmente, se reporta mayor prevalencia del primero en la cavidad oral de individuos sanos (24), lo cual se debe, en parte, a que solo en las últimas décadas se ha reconocido la posibilidad de infecciones orofaciales por HSV-2.

En el presente estudio no se detectó el HSV-1 y cuatro de los 17 pacientes presentaron descarga de HSV-2 sin signos clínicos, en contradicción con lo registrado en la mayoría de trabajos, en los cuales se ha detectado el HSV-1 en mayor medida (25,26).

La descarga de HSV-2 en la cavidad oral se ha evaluado en el contexto de las enfermedades de transmisión sexual; Wald, *et al.* (10), evaluaron 1.388 individuos con antecedentes de infección por HSV-2, de los cuales 44 fueron positivos para este virus en la cavidad oral y tres presentaron lesiones en la mucosa. Según estos autores, aunque la probabilidad de detectar descargas positivas en

la saliva es baja, la inmunosupresión asociada a la infección por HIV puede ser el principal factor de riesgo (10).

Kim, *et al.* (27), evaluaron hisopados orofaríngeos de 109 hombres seropositivos para HSV-2 y detectaron descarga en 82 de ellos, de los cuales 48 eran positivos para el HIV y 34 eran negativos. La descarga estuvo acompañada de lesiones en la mucosa oral, al igual que en los pacientes de este estudio, con lo cual queda claro que la descarga viral no ocurre en todos los individuos infectados.

Sepúlveda, *et al.* (9), compararon 30 niños con cáncer y 27 controles sanos en cuanto a la eliminación oral de HSV-1 y 2, y detectaron la de HSV-1 asociada con pancitopenia grave. Solo uno de los controles presentó descarga positiva para HSV-1 y en ningún caso se detectó una de HSV-2. En el presente trabajo, los pacientes 2 y 13 presentaban leucopenia grave en el momento de la detección del HSV-2 en la saliva, y en los pacientes 5 y 11, el recuento de HSV-2 fue levemente bajo y normal, respectivamente. No obstante, en algunos pacientes con recuentos leucocitarios bajos, no se presentó descarga viral de ninguno de los virus evaluados.

La inmunidad celular controla la producción de partículas virales en los ganglios del trigémino (28,29) y es probable que durante la inmunosupresión causada por el acondicionamiento se reactiven los virus, con el consecuente transporte anterógrado de viriones hacia la mucosa oral, los cuales infectan y se replican en las células epiteliales.

La reacción inmunitaria podría ser más efectiva para controlar la replicación del HSV-2 en ganglios del trigémino que en los ganglios nerviosos de la región sacra, con una posible interacción entre los genes virales y el medio celular específico en cada uno de estos ganglios, lo cual explicaría la infrecuencia de la reactivación del HSV-2 por encima del HSV-1 en ganglios del trigémino en individuos inmunocompetentes y su mayor frecuencia en individuos inmunocomprometidos (10).

La administración de aciclovir a todos los pacientes normalmente previene la reactivación del HSV-1 y del 2. Sin embargo, se ha comprobado que la prevalencia de las infecciones por virus del herpes simple es mayor en individuos inmunocomprometidos, principalmente, en los receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos, con un rango de 4,1 a 10,9 %. Este aumento parece deberse a la aparición de mutantes resistentes en los pacientes receptores de trasplante (30-32).

La probabilidad de las infecciones por HSV en estos pacientes es mayor. De las 105 muestras analizadas en este estudio, en diez tomadas de cuatro pacientes se detectó descarga de HSV-2, lo cual es una proporción baja (9,5 %). El paciente 2 resultó seronegativo para HSV-1 y 2 al ingresar a la unidad de trasplante y, en la semana 4, así como a partir de la semana 6, siempre resultó positivo para HSV-2 en las muestras de saliva.

Se concluyó que, incluso con la administración de aciclovir desde el inicio del acondicionamiento, fue posible detectar la reactivación del HSV-2 en los receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos. Es posible que este grupo de pacientes no estuviera previamente infectado con HSV-1, ni hubiera tenido contacto con el virus durante el tratamiento y, por lo tanto, no presentara la reactivación. Es posible que, a pesar de la inmunosupresión, la reacción inmunitaria impidiera la reactivación o que esta se debiera a la profilaxis antiviral. En el contexto de este trabajo, no fue posible corroborar ninguna de estas hipótesis.

La técnica de PCR anidada empleada en este estudio para detectar el ADN del HSV-1 y 2 se ajustó al protocolo de Sun, *et al.* (21), quienes obtuvieron hisopados de mucosa oral, de piel y de la zona genital. La técnica ha demostrado ser efectiva para detectar el ADN del HSV-1 en ganglios del trigémino obtenidos de cadáveres (33), por lo cual la ausencia del ADN del HSV-1 no parece deberse a una dificultad técnica.

La infección o reactivación del CMV en los pacientes con trasplante es una de las principales causas de complicaciones, y el riesgo es mayor en los casos de un donante positivo y un receptor negativo (34). Los pacientes 3 y 5, que presentaron descargas positivas para CMV en la saliva, recibieron trasplante de donantes IgG positivos, y en la semana 12 la PCR para CMV en el paciente 5 fue positiva en células mononucleares de sangre periférica, aunque en él se había detectado descarga en la saliva desde el momento de la hospitalización.

Se sabe que existe relación entre la inmunosupresión y la reactivación de CMV y EBV (35,36), y en pacientes positivos para HIV-1 se ha corroborado, además, que la descarga en saliva de CMV ocurre independientemente de la detección en sangre o en orina (37).

El CMV permanece latente en células CD34+ y en monocitos CD14+; desde allí puede llegar a distintos órganos y tejidos, como las glándulas

salivares (38), infectar otras células y mantener una producción viral continua, lo cual apunta a que la saliva es la muestra idónea para detectar la reactivación viral (17).

Griffin, *et al.*, evaluaron la relación de las eliminaciones de HSV-1, HSV-2, CMV y EBV en la saliva de pacientes positivos para el HIV-1, y encontraron que en individuos con descargas de EBV era más probable encontrar el ADN de CMV, sobre todo en los días en que se detectaban descargas de HSV o EBV. Los autores concluyeron que habría factores independientes entre sí que influyen en la presencia de la descarga de los tres tipos de virus del herpes en la cavidad oral, pero que también pueden existir interacciones entre estos virus (39).

Los cuatro pacientes de este estudio con eliminaciones de CMV también presentaron EBV, lo cual respalda la hipótesis de que hay mayor probabilidad de detectar descargas de CMV en los días en que también se detecta el EBV (39).

Se observó que la descarga de CMV en la saliva es independiente de la reactivación de la infección en células mononucleares de sangre periférica, como se ha concluido en otros estudios (39). Se debe considerar que la aplasia disminuye la posibilidad de recuperar el ADN de células en sangre periférica, lo cual dificulta el diagnóstico. En el presente trabajo todos los pacientes con resultados positivos en saliva, también tuvieron resultado positivo de antigenemia o en la PCR en sangre periférica, por lo que se puede pensar que no se produjeron falsos positivos en las muestras.

En cuanto a la relación de la descarga de CMV con el recuento leucocitario, es evidente que cuando las muestras eran positivas, los pacientes presentaban leucopenia; es de resaltar, además, que los cuatro pacientes positivos para este virus habían recibido trasplante alogénico de cordón umbilical.

La relación entre la descarga de EBV en saliva y la leucopenia no es tan clara, ya que algunos pacientes presentaron recuentos normales a pesar de haberse detectado la descarga. El paciente 5 tenía diagnóstico de síndrome linfoproliferativo postrasplante asociado con el EBV y en él se detectaron descargas de este virus desde la primera semana.

En este trabajo se detectaron descargas de HSV-2, CMV y EBV en la saliva de pacientes pediátricos receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos asociadas a recuentos

leucocitarios bajos y trasplante alogénico. En los pacientes evaluados se observó que la descarga de virus del herpes en la saliva no fue constante o permanente y que su comportamiento es diferente en sangre periférica.

También, se pudo corroborar que la saliva puede emplearse como un medio seguro y de fácil obtención para evaluar las descargas virales asintomáticas.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Biología Molecular de la Clínica Colombia de Colsanitas, por facilitar el control positivo para CMV, y a los pacientes, acudientes y personal médico y paramédico de la Unidad de Trasplante de Precursores Hematopoyéticos de la Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiación

Este proyecto fue financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, y la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad El Bosque.

Referencias

1. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet*. 2001;357:1513-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04638-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04638-9)
2. Doumas S, Vladikas A, Papagianni M, Kolokotronis A. Human cytomegalovirus-associated oral and maxillo-facial disease. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:557-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01714.x>
3. Davison AJ. Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol*. 2010; 143:52-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.014>
4. Wald A, Corey L. Persistence in the population: Epidemiology and transmission. En: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, *et al.*, editors. *Human herpesviruses: Biology, therapy and immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press;2007. p. 1-31.
5. Wilson AC, Mohr I. A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons. *Trends Microbiol*. 2012;20:604-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2012.08.005>
6. Sinclair JH, Reeves MB. Human cytomegalovirus manipulation of latently infected cells. *Viruses*. 2013;5:2803-24. <http://dx.doi.org/doi:10.3390/v5112803>
7. Tsurumi T, Fujita M, Kudoh A. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol*. 2005;15:3-15. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.441>
8. Sacks SL, Griffiths PD, Corey L, Cohen C, Cunningham A, Dusheiko GM, *et al.* HSV shedding. *Antiviral Res*. 2004;63(Supl.1):S19-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.06.004>

9. **Sepúlveda E, Rojas IG, Brethauer U, Maulén NP, Muñoz M, Kirsten L, et al.** Effect of white cell counts on the presence of human herpes simplex virus type-1 in saliva of pediatric oncology patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105:583-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.12.035>
10. **Wald A, Eriksson M, Krantz E, Selke S, Corey L.** Oral shedding of herpes simplex virus type 2. *Sex Transm Infect.* 2004;80:272-6. <http://dx.doi.org/10.1136/sti.2003.007823>
11. **Morfin F, Bilger K, Boucher A, Thiebaut A, Najjoulah F, Bleyzac N, et al.** HSV excretion after bone marrow transplantation: A 4-year survey. *J Clin Virol.* 2004;30:341-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2004.03.002>
12. **Cannon MJ, Hyde TB, Schmid DS.** Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol.* 2011;21:240-55. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.695>
13. **Jaskula E, Dlubek D, Sedzimirska M, Duda D, Tarnowska A, Lange A.** Reactivations of cytomegalovirus, human herpes virus 6, and Epstein-Barr virus differ with respect to risk factors and clinical outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Proc.* 2010;42:3273-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.07.027>
14. **Hug M, Dorner M, Fröhlich FZ, Gysin C, Neuhaus D, Nadal D.** Pediatric Epstein-Barr virus carriers with or without tonsillar enlargement may substantially contribute to spreading of the virus. *J Infect Dis.* 2010;202:1192-9. <http://dx.doi.org/10.1086/656335>
15. **Lucht E, Biberfeld P, Linde A.** Epstein-Barr virus (EBV) DNA in saliva and EBV serology of HIV-1-infected persons with and without hairy leukoplakia. *J Infect.* 1995;31:189-94.
16. **Cordonnier C.** Infections after HSCT. In: Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T, editors. *ESH-EBMT Handbook. Haematopoietic Stem Cell Transplantation.* 5th edition. Paris: European School of Haematology; 2008. p. 198-217.
17. **Correia-Silva JdeF, Victória JM, Guimarães AL, Salomão UE, de Abreu MH, Bittencourt H, et al.** Cytomegalovirus shedding in the oral cavity of allogeneic haematopoietic stem cell transplant patients. *Oral Dis.* 2007;13:163-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2006.01240.x>
18. **Preiksaitis JK, Díaz-Mitoma F, Mirzayans F, Roberts S, Tyrrell DL.** Quantitative oropharyngeal Epstein-Barr virus shedding in renal and cardiac transplant recipients: Relationship to immunosuppressive therapy, serologic responses, and the risk of post-transplant lymphoproliferative disorder. *J Infect Dis.* 1992;166:986-94. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/166.5.986>
19. **Perera RA, Samaranayake LP, Tsang CS.** Shedding dynamics of Epstein-Barr virus: A type 1 carcinogen. *Arch Oral Biol.* 2010;55:639-47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.06.009>
20. **Kessler HH, Pierer K, Weber B, Sakrauski A.** Detection of herpes simplex virus DNA from cerebrospinal fluid by PCR and a rapid, nonradioactive hybridization technique. *J Clin Microbiol.* 1994;32:1881-6.
21. **Sun Y, Kum R, Hoon S, Pei P.** Detection and genotyping of human herpes simplex viruses in cutaneous lesions of erythema multiforme by nested PCR. *J Med Virol.* 2003;71:423-8. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.10502>
22. **Shin CH, Park GS, Hong KM, Paik MK.** Detection and typing of HSV-1, HSV-2, CMV and EBV by quadruplex PCR. *Yonsei Med J.* 2003;44:1001-7. <http://dx.doi.org/10.3349/ymj.2003.44.6.1001>
23. **Sahin F, Gerceker D, Karasartova D, Ozsan TM.** Detection of herpes simplex virus type 1 in addition to Epstein-Bar virus in tonsils using a new multiplex polymerase chain reaction assay. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;57:47-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.09.013>
24. **Miller CS, Danaher RJ.** Asymptomatic shedding of herpes simplex virus (HSV) in the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105:43-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.06.011>
25. **Hyland PL, Coulter WA, Ruman A, Fulton CR, O'Neill HJ, Coyle PV, et al.** Asymptomatic shedding of HSV-1 in patients undergoing oral surgical procedures and attending for noninvasive treatment. *Oral Dis.* 2007;13:414-8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2007.01316.x>
26. **Scott DA, Coulter WA, Lamey PJ.** Oral shedding of herpes simplex virus type 1: A review. *J Oral Pathol Med.* 1997;26:441-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.1997.tb00012.x>
27. **Kim HN, Meier A, Huang ML, Kuntz S, Selke S, Celum C, et al.** Oral herpes simplex virus type 2 reactivation in HIV-positive and HIV-negative men. *J Infect Dis.* 2006;194:420-7. <http://dx.doi.org/10.1086/505879>
28. **Christensen J, Thomsen A.** Coordinating innate and adaptive immunity to viral infection: Mobility is the key. *APMIS.* 2009;117:338-55. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02451.x>
29. **Bonjardim A.** Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses and viruses counteract IFN action. *Microbes Infect.* 2005;7:569-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2005.02.001>
30. **Piret J, Boivin G.** Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: Mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:459-72. <http://dx.doi.org/10.1128/ACC.00615-10>
31. **Chakrabarti S, Pillay D, Ratcliffe D, Cane PA, Collingham KE, Milligan DW.** Resistance to antiviral drugs in herpes simplex virus infections among allogeneic stem cell transplant recipients: Risk factors and prognostic significance. *J Infect Dis.* 2000;181:2055-8. <http://dx.doi.org/10.1086/315524>
32. **Danve-Szatanek C, Aymard M, Thouvenot D, Morfin F, Agius G, Bertin I, et al.** Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up. *J Clin Microbiol.* 2004;42:242-9. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.1.242-249.2004>
33. **Bernal LJ, Ávila LV, Marín LM, Casas JA, Bohórquez SP, Barrientos S, et al.** Detección de la presencia de antígeno y ADN de virus herpes simplex tipo 1 en ganglios trigeminales humanos. *Univ Odontol.* 2012;31:117-24.
34. **Manuel O, Panq XL, Humar A, Humar D, Doucette K, Preiksaitis JK.** An assessment of donor-to-recipient transmission patterns of human cytomegalovirus by analysis of viral genomic variants. *J Infect Dis.* 2009;199:1621-8. <http://dx.doi.org/10.1086/598952>

35. **Chêne A, Nylén S, Donati D, Bejarano MT, Kironde F, Wahlgren M, *et al.*** Effect of acute *Plasmodium falciparum* malaria on reactivation and shedding of the eight human herpes viruses. PLoS ONE. 2011;6:e26266. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0026266>
36. **Lucht E, Brytting M, Bjerregaard L, Julander I, Linde A.** Shedding of cytomegalovirus and herpesviruses 6, 7, and 8 in saliva of human immunodeficiency virus type 1-infected patients and healthy controls. Clin Infect Dis. 1998;27:137-41. <http://dx.doi.org/10.1086/514604>
37. **Greenberg MS, Dubin G, Stewart JC, Cumming CG, MacGregor RR, Friedman HM.** Relationship of oral disease to the presence of cytomegalovirus DNA in the saliva of AIDS patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1995;79:175-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S1079-2104\(05\)80278-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1079-2104(05)80278-1)
38. **Sinclair J, Reeves M.** The intimate relationship between human cytomegalovirus and the dendritic cell lineage. Front Microbiol. 2014;7:1-14. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00389>
39. **Griffin E, Krantz E, Selke S, Huang ML, Wald A.** Oral mucosal reactivation rates of herpes viruses among HIV-1 seropositive persons. J Med Virol. 2008;80:1153-9. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21214>

CARTA AL EDITOR

Bucaramanga, 3 de marzo de 2016

Señores
Comité Editorial
Revista *Biomédica*
Bogotá

Apreciados señores:

Hemos leído con interés el artículo publicado por Calvo, *et al.* (1), sobre el diagnóstico diferencial de dengue y chikungunya en población pediátrica. Ciertamente, preocupa el subdiagnóstico de muchas de estas infecciones endémicas y emergentes, más aún con la aparición en los últimos tres años de nuevos arbovirus con menor letalidad que el dengue, pero con eventuales secuelas, sobre todo neurológicas, como el chikungunya y el zika. En el estudio en cuestión, llama la atención que 50 % de los casos reportados correspondiera al periodo neonatal y que la mayoría fuera diagnosticada inicialmente como sepsis neonatal.

Se sabe del riesgo de esta población frente al dengue congénito y adquirido, y su expresión clínica, que varía desde los casos subclínicos hasta los fatales. Se estima que el dengue es responsable de 12.000 muertes anuales en el continente, principalmente en la población pediátrica. En las Américas se ha experimentado un aumento importante de casos en los últimos 30 años, especialmente en Colombia, Brasil, Venezuela y Paraguay, en donde se concentran 83 % de los casos anuales (2). Por otro lado, aunque la presencia de estos arbovirus se registra en regiones tropicales y subtropicales, ya se han detectado cambios en el vector debidos a factores climáticos, como se ha evidenciado y documentado plenamente en México, por ejemplo (3).

A la endemia de dengue se ha sumado la epidemia de chikungunya desde finales del 2013, cuya letalidad es menor que la del dengue, pero presenta complicaciones, especialmente en adultos mayores y en niños, entre quienes también se han registrado casos fatales, secuelas como la artritis grave e incapacitante (4) y el riesgo de compromiso neurológico en neonatos (5). La fiebre de chikungunya por transmisión perinatal o adquirida, tiene características similares a las del dengue en neonatos.

En algunas ocasiones, la infección por chikungunya puede afectar múltiples órganos y tener un desenlace fatal hasta en 37 % de los pacientes, según lo reportado en una serie de casos en Colombia (6).

En el estudio que nos ocupa (1), llama la atención que solo en uno de los casos se confirmó la infección concomitante de dengue y chikungunya mediante PCR en tiempo real. Consideramos que una PCR en tiempo real positiva para chikungunya y una IgM positiva para dengue no implican necesariamente la presencia de infección simultánea, pues se ha demostrado que la IgM puede ser positiva hasta tres meses después de la infección (probable infección reciente) (7), salvo en los pacientes con días de nacidos (cuatro pacientes de 4 a 16 días de nacidos en el estudio).

La infección concomitante puede presentarse, pero consideramos que debe determinarse con la mejor opción diagnóstica posible para detectar la aparición concurrente de los virus, es decir, la PCR en tiempo real (8,9). Esto cobra más importancia en el estudio de aquellos arbovirus con los que puede haber reacción cruzada, por ejemplo, entre el virus del dengue y el de zika, lo cual es de particular importancia en regiones con circulación simultánea de estos agentes patógenos (8,9).

Por ello, siempre debe descartarse la infección concomitante. Y, aunque el dengue no se reporta frecuentemente en el periodo neonatal, dadas las condiciones de riesgo comentadas debe ampliarse la vigilancia en este grupo etario.

El panorama no es mejor con la infección emergente de zika, la cual se ha relacionado con efectos neurológicos adversos en la población neonatal. El aumento de casos de microcefalia en Brasil asociado a la infección de zika durante el embarazo alertó sobre su posible actividad teratogénica. Este efecto no ha sido reportado en los casos de dengue o chikungunya (10) y, aunque parece haber un nexo epidemiológico entre microcefalia y zika, su patogenia no se ha aclarado totalmente y, hasta la fecha, no hay pruebas incontrovertibles sobre su implicación en esta condición. Está demostrada, en cambio, la presencia de ARN viral en muestras de líquido amniótico, lo cual genera el riesgo de infección fetal y de daño neurológico, incluida la microcefalia (11). Además del riesgo de malformaciones, el zika también implica un riesgo de infección perinatal, como sucede con el dengue (parto prematuro,

muerte fetal, bajo peso) y el chikungunya (encefalopatía) (12). El subdiagnóstico de estos dos virus en neonatos en nuestro país puede ser muy grave. Las inquietudes que han surgido en torno al zika suscitan preocupación sobre las eventuales consecuencias de la epidemia de chikungunya en este grupo poblacional. Según las publicaciones, hay mayor riesgo de compromiso neurológico en los niños, y se desconoce si las infecciones subclínicas o de poca gravedad tendrían alguna repercusión a largo plazo, por lo cual se requieren estudios a mayor escala y con seguimiento prospectivo complementario.

Atentamente,

Jorge L. Alvarado-Socorrás
Organización Latinoamericana para el Fomento de la Investigación en Salud (OLFIS),
Bucaramanga, Santander, Colombia; Unidad de Neonatología, Departamento de Pediatría, Fundación Cardiovascular de Colombia, Bucaramanga, Santander, Colombia

Fredi Alexander Diaz-Quijano
Organización Latinoamericana para el Fomento de la Investigación en Salud (OLFIS),
Bucaramanga, Santander, Colombia; Departamento de Epidemiología, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Alfonso J. Rodríguez-Morales
Organización Latinoamericana para el Fomento de la Investigación en Salud (OLFIS),
Bucaramanga, Santander, Colombia; Grupo de Investigación Salud Pública e Infección, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia

Referencias

1. **Calvo EP, Coronel-Ruiz C, Velazco S, Velandia-Romero M, Castellanos JE.** Diagnóstico diferencial de dengue y chikungunya en pacientes pediátricos. *Biomédica*. 2016;36 (Supl.2). <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2982>
2. **Zambrano B, San Martín JL.** Epidemiology of dengue in Latin America. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2014;3:181-2. <http://dx.doi.org/10.1093/jpids/piu071>
3. **Lozano-Fuentes S, Hayden MH, Welsh-Rodríguez C, Ochoa-Martínez C, Tapia-Santos B, Kobylinski KC, et al.** The dengue virus mosquito vector *Aedes aegypti* at high elevation in México. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;87:902-9. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0244>
4. **Alfaro-Tolosa P, Clouet-Huerta DE, Rodríguez-Morales AJ.** Chikungunya, the emerging migratory rheumatism. *Lancet Infect Dis*. 2015;15:510-2. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70160-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70160-X)
5. **Gérardin P, Sampériz S, Ramful D, Boumahni B, Bintner M, Alessandri JL, et al.** Neurocognitive outcome of children exposed to perinatal mother-to-child Chikungunya virus infection: The CHIMERE cohort study on Reunion Island. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e2996. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002996>
6. **Villamil-Gómez W, Alba-Silvera L, Menco-Ramos A, González-Vergara A, Molineros-Palacios T, Barrios-Corrales M, et al.** Congenital Chikungunya virus infection in Sincelejo, Colombia: A case series. *J Trop Pediatr*. 2015;61:386-92. <http://dx.doi.org/10.1093/tropej/fmv051>
7. **Nisalak A.** Laboratory diagnosis of dengue virus infections. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2015;46 (Suppl.1):55-76.
8. **Villamil-Gómez WE, González-Camargo O, Rodríguez-Ayubi J, Zapata-Serpa D, Rodríguez-Morales AJ.** Dengue, chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. *J Infect Public Health*. 2016 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2015.12.002>
9. **Villamil-Gómez WE, Rodríguez-Morales AJ.** Reply: Dengue RT-PCR-Positive, Chikungunya IgM-Positive and Zika RT-PCR-Positive co-infection in a patient from Colombia. *J Infect Public Health*. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2016.02.003>
10. **Rodríguez-Morales AJ.** Zika: The new arbovirus threat for Latin America. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9:684-5. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.7230>
11. **Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM.** Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016;47:6-7. <http://dx.doi.org/10.1002/uog.15831>
12. **Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau VM, Musso D.** Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill*. 2014;19:pii=20751. <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751>

Bogotá, 17 de marzo de 2016

Señores
Comité Editorial
Revista *Biomédica*
Bogotá

Respetados señores:

Hemos recibido los comentarios de Alvarado-Socorrás, *et al.*, a nuestro artículo "Diagnóstico diferencial de dengue y chikungunya en pacientes pediátricos" publicado en el suplemento 1, volumen 36, de la revista *Biomédica*.

Agradecemos la lectura juiciosa del documento y compartimos su expresa preocupación por el subdiagnóstico de las arbovirosis que han venido afectando a la población colombiana en los últimos

años. Hemos revisado sus comentarios y frente a ello debemos aclarar que estamos de acuerdo con lo que los autores manifiestan: el mejor método para confirmar una infección o una infección concomitante es la detección molecular de los dos virus, prueba que hicimos en todas las muestras de los pacientes incluidos en el estudio (cuadro 2 del artículo). Además, en neonatos también es posible confirmar una infección aguda si la prueba de IgM es positiva (pacientes 371, 511 y 958-3 de nuestro estudio).

En los casos del niño de dos meses y en del de cuatro años, la definición de caso positivo para DENV es un poco más compleja pues, por ser habitantes de una zona endémica, podrían haberse infectado tiempo atrás y todavía tener títulos de IgM detectables (1). No obstante, dado que en los dos casos las pruebas de IgG fueron negativas, podía concluirse que se trataba de infecciones primarias y recientes. Si bien la prueba virológica para DENV fue negativa, la definición de estos dos casos como positivos para dengue con base en los resultados de las dos pruebas serológicas (IgM positiva e IgG negativa) era posible.

El resultado en la prueba serológica de referencia constituye la evidencia de la seroconversión o del aumento de los títulos de anticuerpos en muestras pareadas, pero esta condición es muy poco frecuente en nuestros servicios de salud. Por esta razón, el análisis de IgM en un 'monosero' es la variable operativa más frecuentemente usada

para confirmar casos, no solo en la vigilancia sino también en la investigación (2,3). Dadas las limitaciones para la interpretación de la IgM en dengue, esta es la herramienta más ampliamente utilizada, incluso para confirmar infecciones simultáneas de DENV y CHIKV (4).

Por último, reiteramos la urgencia de implementar un algoritmo de diagnóstico adecuado que permita la identificación del agente causante del síndrome febril para, así, fortalecer el manejo correcto del paciente y el control de la transmisión.

Atentamente,

Eliana Calvo T.

Referencias

1. **Castellanos JE, Coronel-Ruiz C.** El diagnóstico en dengue: un rompecabezas a resolver. *Rev Fac Med.* 2014;62:455-64. <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v62n4.45593>.
2. **Cordeiro MT, Silva AM, Brito CA, Nascimento EJ, Magalhaes MC, Guimaraes GF, et al.** Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:1128-34.
3. **Restrepo BN, Piedrahita LD, Agudelo IY, Marín K, Ramírez R.** Infección por dengue: una causa frecuente de síndrome febril en pacientes de Quibdó, Chocó, Colombia. *Biomédica.* 2015;35:131-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0120-41572015000100016>.
4. **Taraphdar D, Sarkar A, Mukhopadhyay BB, Chatterjee S.** A comparative study of clinical features between monotypic and dual infection cases with Chikungunya virus and dengue virus in West Bengal, India. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86:720-3. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0704>.

Información e instrucciones para los autores

Biomédica es la revista científica del Instituto Nacional de Salud de Colombia. Su fin primordial es la difusión de trabajos originales que contribuyan a ampliar los conocimientos en biomedicina.

Política editorial de la revista

Biomédica acepta y se acoge a los lineamientos establecidos por el *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE) (www.icmje.org), por *Equator Network* (<http://www.equator-network.org/>) y por el *Committee on Publication Ethics* (COPE) (<http://publicationethics.org/>) para garantizar la calidad de las publicaciones científicas, su transparencia, integridad y debida salvaguarda de los principios éticos que rigen la investigación biomédica.

La política de reconocimiento de autoría de la revista *Biomédica* se ciñe a la orientación del ICMJE. Este Comité señala que

“El crédito de autoría debe basarse solamente en:

- (1) contribuciones sustanciales a la concepción y el diseño del manuscrito, o a la adquisición, análisis e interpretación de los datos;
- (2) la redacción del manuscrito o la revisión crítica de contenido intelectual importante;
- (3) la aprobación final de la versión que se publicará, y
- (4) la asunción de la responsabilidad frente a todos los aspectos del manuscrito, para garantizar que los asuntos relativos a la exactitud o integridad de cualquier parte del mismo sean apropiadamente investigados y resueltos.

Para que a alguien se le reconozca como autor, debe satisfacer las cuatro condiciones mencionadas. La adquisición de fondos, la recolección de datos o la supervisión general del grupo de investigación por sí mismos, no justifican la autoría”.

La revista *Biomédica* no acepta la inclusión o el retiro de autores después de haberse iniciado el proceso editorial de los manuscritos. En casos excepcionales en que ello se permita, es obligatorio obtener el consentimiento por escrito de los autores cuyos nombres vayan a ser eliminados del manuscrito o agregados a él. Además, se debe enviar una declaración firmada haciendo constar que todos los autores reúnen los criterios de autoría y que no existen otros autores que, reuniendo los criterios,

hayan sido omitidos, y volver a mencionar en detalle la contribución de cada persona a la investigación y al manuscrito.

Registro de ensayos clínicos

Biomédica apoya las políticas de registro de ensayos clínicos de la Organización Mundial de la Salud y del *International Committee of Medical Journal Editors*. Por consiguiente, solamente aceptará para publicación los manuscritos de investigaciones clínicas que hayan recibido un número de identificación en uno de los registros de ensayos clínicos validados por los criterios establecidos por las instituciones antes mencionadas. El número de identificación y el sitio de registro se deben incluir al final del resumen del manuscrito.

Derechos de autor

Ninguna publicación, nacional o extranjera, puede reproducir ni traducir los artículos ni sus resúmenes, sin previa autorización escrita del Comité Editorial de la revista *Biomédica*.

Declaración de privacidad

Los nombres y las direcciones de correo electrónico suministradas a la revista se utilizarán exclusivamente para los propósitos declarados y no se pondrán a disposición de ninguna otra persona o institución.

Proceso editorial

Todo material propuesto para publicación en la revista será revisado inicialmente por el Comité Editorial y enviado luego para evaluación externa a evaluadores o pares científicos. Para facilitar este paso, junto con el manuscrito, los autores deben enviar a través del sistema en línea, un archivo complementario que contenga el nombre, la afiliación y el correo electrónico de cuatro posibles evaluadores nacionales y cuatro internacionales. Los nombres de los evaluadores sugeridos no deben incluirse dentro del manuscrito.

Una vez que el autor reciba los comentarios de los evaluadores, debe proceder a contestarlos punto por punto y a incorporar las modificaciones correspondientes en el texto, en un plazo de dos semanas. Si en el transcurso de las cuatro semanas siguientes, *Biomédica* no ha recibido la respuesta de los autores, el Comité Editorial retirará el manuscrito.

Una vez aceptado el manuscrito para publicación, el Comité Editorial no aceptará modificaciones sobre su contenido y se solicitará enviar una declaración de cesión a la revista de los derechos de reproducción, la cual debe ser firmada por todos los autores. Además, los autores deben hacer revisar la calidad del inglés del manuscrito o del resumen, por parte de un experto en el idioma, y enviar la certificación a la revista en un plazo menor a dos semanas.

La revista *Biomédica* se reserva el derecho de aceptar o rechazar los manuscritos sometidos para publicación, y hará sugerencias que tiendan a mejorar su presentación y a garantizar la integridad de la publicación.

Los manuscritos originales aceptados para publicación, se mantendrán en los archivos de la revista durante mínimo un año a partir de la fecha de publicación.

Después de la edición y la corrección de estilo, los autores recibirán las galeras del artículo, las cuales deben ser cuidadosamente revisadas y devueltas al editor en un término máximo de 48 horas.

Una vez realizada la publicación de la revista, el autor principal recibirá, libre de costo, cinco ejemplares de la revista.

La revista *Biomédica* es de acceso libre e incluye metadatos de citación para todas las referencias de los artículos publicados y las deposita en *CrossRef* (<http://www.crossref.org/>).

Información general sobre los manuscritos

Biomédica publica trabajos científicos, escritos en español o en inglés, en las siguientes categorías.

Artículo original: trabajo inédito derivado de una investigación biomédica que aporta información nueva sobre aspectos específicos y contribuye de manera relevante al conocimiento científico.

Comunicación breve: es el informe de resultados parciales o finales de una investigación, cuya divulgación rápida sea de gran importancia.

Nota técnica: describe en detalle una técnica de laboratorio novedosa o modificaciones de una técnica ya establecida, enfatizando las ventajas que tiene el procedimiento o la innovación desarrollados.

Ensayo: es un manuscrito filosófico, literario o científico que presenta la opinión sustentada del autor sobre un tema específico o de actualidad.

Comentario: manuscrito sobre un artículo publicado en la revista.

Reseña histórica: es un manuscrito que destaca personajes o sucesos y su contribución al desarrollo de las ciencias biomédicas o de las políticas en salud.

Revisión de tema: presenta el estado actual del conocimiento sobre un tema; puede ser de dos tipos:

- 1) solicitada directamente por el Comité Editorial a personas expertas en el tema,
- 2) presentada por profesionales interesados en un tema en particular. En este caso, se debe enviar inicialmente al Comité Editorial la propuesta en la que se indique por qué el tema escogido es pertinente para los lectores de *Biomédica*, así como una breve descripción del contenido, las referencias clave, las publicaciones de los autores sobre el tema que serán incluidas (requisito obligatorio), los datos inéditos de los autores que se incluirán en la revisión (requisito obligatorio), la probable extensión del documento y el número aproximado de ilustraciones.

En ambos casos, los autores deben estructurar la revisión de la siguiente manera:

- incluir un resumen con énfasis en el significado de los hallazgos recientes;
- una introducción al tema, señalando hitos pasados y desarrollos presentes;
- encabezamientos en el texto, con el objeto de hacer más provechosa su lectura;
- la revisión debe incluir un análisis crítico de la bibliografía y los datos propios de los autores;
- el desarrollo del tema queda a discreción del autor, pero se aconseja que incluya tablas, esquemas y figuras, que hagan ágil el texto y ofrezcan una comprensión más rápida de su contenido. En caso de usar figuras tomadas total o parcialmente de otras publicaciones, los autores deben adjuntar el permiso de la casa editorial que ostente los derechos de autor para su reproducción en *Biomédica*.

Imágenes en biomedicina: es un trabajo ilustrado con fotografías que muestran y explican de manera didáctica un concepto, una estructura, una enfermedad o un diagnóstico biomédico. Debe incluir un comentario corto que resalte la importancia del tema ilustrado.

Haga usted el diagnóstico: pretende retar la capacidad diagnóstica de los lectores, utilizando ilustraciones o fotografías de casos clínicos o de hallazgos microscópicos. Consta de dos partes, la presentación clínica y los hallazgos correspondientes, y el diagnóstico correcto; este último aparece en una página aparte y debe acompañarse de un comentario actualizado sobre la entidad que se pretende ilustrar.

Presentación de casos: son ejemplos de casos clínicos que destacan alguna particularidad o señalan un hallazgo especial de la enfermedad, con una revisión breve de las publicaciones pertinentes.

Cartas al editor: los lectores pueden solicitar aclaraciones o presentar comentarios sobre el material publicado en la revista. La decisión sobre la publicación de las cartas recibidas queda a discreción del Comité Editorial.

Comentarios bibliográficos: son escritos críticos breves sobre libros de salud o de biomedicina.

Preparación del manuscrito

Los autores deben ceñirse a las indicaciones del *International Committee of Medical Journal Editors*, que se encuentran publicadas como *Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (Updated December 2013)* (<http://icmje.org/icmje-recommendations.pdf>).

El manuscrito debe incluir las siguientes secciones.

Hoja de presentación: esta sección debe incluir

- título (máximo 165 caracteres),
- título corto para los encabezamientos de las páginas (máximo 50 caracteres),
- título en inglés (máximo 165 caracteres),
- un párrafo con los nombres completos de los autores únicamente con el primer apellido,
- la afiliación institucional integrada por grupo, institución, ciudad y país. La afiliación institucional se relaciona con los autores con números en superíndice y en ella se deben omitir cargos y títulos académicos,
- datos de correspondencia: nombre del autor responsable, dirección completa, número telefónico y de fax, y dirección electrónica, y
- párrafo donde los autores declaren cuál fue el aporte al documento de cada uno de ellos.

Resúmenes: el trabajo debe incluir un resumen estructurado en español e inglés, con los subtítulos introducción, objetivo, materiales y métodos, resultados y conclusión. Los resúmenes no deben exceder las 250 palabras. No se permite el uso de referencias ni se recomienda la inclusión de siglas o acrónimos.

Palabras clave: se requieren de 6 a 10 palabras clave en cada idioma; consulte los Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS) del índice de la Literatura Latinoamericana y del Caribe en Ciencias de la Salud (LILACS) en <http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>; para verificar las de inglés, consulte los *Medical Subject Headings* (MeSH) del *Index Medicus* en <http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm>.

Texto: todo el manuscrito, incluso la página del título, los resúmenes, las referencias, las leyendas de figuras y cuadros, debe estar escrito en letra Arial de 12 puntos de tamaño a doble espacio y alineado a la izquierda, sin dejar espacios extras entre párrafos; se debe dejar un solo espacio después del punto y seguido o del punto y aparte.

Los cuadros se deben configurar en letra Arial de 10 puntos de tamaño a espacio sencillo.

Se debe usar letra bastardilla o cursiva para los términos científicos, sin subrayarlos.

Los números decimales en español deben separarse de los números enteros por comas, no por puntos.

Formato electrónico: el manuscrito se debe enviar en Word, preferiblemente en la versión 97-2003. Además de ser adjuntas al documento de Word, las figuras se deben enviar preferentemente como fichero complementario en formato tiff (*Tagged Image File Format*) de 300 dpi (*dots per inch*). Las gráficas elaboradas en *PowerPoint* o *Word* son de baja resolución, por lo tanto, no se deben incluir este tipo de imágenes en formato electrónico. Las ilustraciones se imprimen en una columna (75 mm) o en dos columnas (153 mm); por consiguiente, se deben enviar las ilustraciones del tamaño en que van a quedar impresas. Si las ilustraciones son en color y se remiten en formato electrónico, se deben enviar en archivos CMYK en formato tiff (*Tagged Image File Format*) de alta resolución. Si la imagen no tiene texto incluido, la resolución óptima para los archivos CMYK es de 300 dpi; si incluye texto, la resolución recomendada es de 600 dpi y, si son de blanco y negro, de 1.200 dpi. La fuente preferida para las gráficas es Helvética. Si sus archivos son de Macintosh, debe convertirlos a uno de

los formatos mencionados. Se requiere una lista completa de los archivos enviados, que incluya los programas cuyo formato se utilizó.

Agradecimientos: cuando en esta sección se nombren personas, los autores deben certificar que ellos tienen conocimiento y están de acuerdo con aparecer en los agradecimientos. Esto no es necesario cuando se nombran entidades.

Conflicto de intereses y financiación: los autores deben incluir, antes de las referencias del manuscrito, un párrafo en el que expresen si existen conflictos de intereses o si no los hay. Además, debe presentarse otro párrafo que incluya la fuente de financiación de la investigación adelantada.

Biomédica acoge las recomendaciones del ICMJE y adopta el formato de declaración de potenciales conflictos de intereses, el cual debe ser diligenciado individualmente por cada uno de los autores del manuscrito y enviado junto con la carta de remisión. El formulario electrónico está disponible en <http://www.icmje.org/conflicts-of-interest/>.

Referencias bibliográficas: es indispensable observar estrictamente las indicaciones de los requisitos uniformes para manuscritos del área biomédica. Se le asigna un número a cada referencia citada del texto, así como a los cuadros y a las figuras, en orden ascendente. Los números de las referencias se anotan entre paréntesis y no como superíndice.

Las comunicaciones personales, los datos sin publicar, los manuscritos en preparación o sometidos para publicación y los resúmenes de trabajos presentados en congresos, se deben citar entre paréntesis en el cuerpo del manuscrito y no en la sección de referencias.

La abreviatura exacta de la revista citada se debe consultar en la lista de publicaciones periódicas del *Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>); si la revista no aparece, se escribe el título completo de la revista. Solo se deben transcribir los seis primeros autores del artículo, seguidos de *et al.* Se recomienda la inclusión de referencias nacionales y latinoamericanas, para lo cual se puede consultar Lilacs, Pubindex, Latindex, Redalyc, Sibra y otras fuentes bibliográficas pertinentes.

En caso de dudas sobre la forma correcta de citar una referencia (artículo científico, libro, tesis, página de internet, etc.), se sugiere consultar la página http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html, en la cual se encuentran ejemplos de todos y cada uno de los posibles casos.

A continuación se dan algunos ejemplos para el estilo de las referencias, siguiendo las normas de Vancouver.

Revista científica: la forma adecuada de citar revistas científicas es la siguiente (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título. Abreviatura de la revista. Año; volumen: página inicial-página final. <http://dx.doi.org/>

Ejemplo:

Sánchez J, Villada OA, Rojas ML, Montoya L, Díaz A, Vargas C, et al. Efecto del zinc aminoquelado y el sulfato de zinc en la incidencia de la infección respiratoria y la diarrea en niños preescolares de centros infantiles. *Biomédica*. 2014;34:79-91. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1581>

Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294:15-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.008>

Libro o documento: la forma adecuada de citar libros o documentos es (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título. Edición (en los casos que corresponda). Ciudad de publicación: editorial; año. página inicial-página final o número total de páginas.

Ejemplo:

Bernard HR. Research methods in anthropology: Qualitative and quantitative approaches. Second edition. Thousand Oaks, CA: Sage Publications; 1994. 585 p.

Capítulo de libro o documento: la forma adecuada de citar capítulos de libros o documentos es la siguiente (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título del capítulo. En: autor del libro, editores. Título del libro. Edición (en los casos que corresponda). Ciudad de publicación: editorial; año. página inicial-página final.

Ejemplo:

Franco JL, Orrego JC, Montoya CJ, Patiño PJ. Síndrome de infección recurrente. En: Correa JA, Gómez JF, Posada R, editores. Fundamentos

de Pediatría. Tercera edición. Medellín: Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas; 2007. p. 15-50.

Documentos en páginas web: la forma adecuada de citar documentos publicados en páginas web, es la siguiente (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título. Fecha de consulta: día, mes, año. Disponible en: página exacta en donde abre el documento.

Ejemplo:

Ministerio de la Protección Social. Actualización integral del POS 2013. Fecha de consulta: 26 de febrero del 2014. Disponible en: <http://www.pos.gov.co/Documents/LISTADO%20MEDICAMENTOS%20ACUERDO%20008%20CRES.pdf>.

Cuadros y figuras: los cuadros se elaboran usando el formato de Word; abstenerse de preparar archivos en columnas o tabulados en el texto mismo del manuscrito.

En las preparaciones de microscopio, se deben mencionar la coloración y el aumento según el objetivo utilizado, sin incluir el valor del ocular.

Cuando se utilicen cuadros o figuras que ya hayan sido publicados, se requiere enviar la autorización de la casa editorial que ostenta los derechos de reproducción.

Remisión del manuscrito

El manuscrito debe ser remitido a través del sistema en línea disponible en el enlace de información para autores en <http://www.revistabiomedica.org/>.

Sin embargo, se debe enviar la carta impresa de remisión firmada en original por todos los autores, en la que conste que todos conocen y están de

acuerdo con su contenido, y que el manuscrito no ha sido publicado anteriormente ni se ha sometido a publicación simultánea en otra revista, a la oficina de la revista ubicada en la siguiente dirección:

Revista Biomédica
Instituto Nacional de Salud
Avenida Calle 26 N° 51-20, bloque B, oficina B-245
Bogotá, D.C., Zona 6, Colombia, S.A.

Los autores radicados en otros países pueden enviar la carta de remisión firmada y escaneada desde sus correos electrónicos personales, al correo de la revista (biomedica@ins.gov.co), informando que se entrega por este medio por encontrarse en el exterior.

Solo cuando se reciba la carta de remisión en la oficina de la revista (autores nacionales), o todos los correos (autores internacionales), se iniciará el proceso de revisión editorial del manuscrito.

Al someter un manuscrito para publicación en *Biomédica*, los autores aceptan con su firma, explícita o implícitamente, que:

- 1) Conocen las instrucciones para los autores y las han seguido detalladamente.
- 2) Todos los autores cumplen todos los criterios internacionalmente aceptados para ser considerados como tal.
- 3) No se ha excluido de la lista de autores el nombre de ningún autor que reúna los requisitos para serlo.
- 4) Todos los autores conocen la versión final del manuscrito sometido para publicación y están de acuerdo con ella.
- 5) No se ha incurrido en conducta alguna que pueda considerarse como transgresión de la integridad científica o de los principios éticos que rigen las publicaciones científicas.

BIOMÉDICA

Lista de verificación

Con el fin de comprobar que se hayan cumplido todas las instrucciones correspondientes a las normas de publicación de la revista *Biomédica*, le solicitamos que diligencie en línea la siguiente lista de verificación y la presente junto con su manuscrito.

Categoría

- | | | |
|---|--|---------------------------------------|
| ☐ Artículo original | ☐ Comunicación breve | ☐ Nota técnica |
| ☐ Revisión de tema | ☐ Reseña histórica | ☐ Ensayo |
| ☐ Comentario | ☐ Imágenes en biomedicina | |
| ☐ Presentación de caso | ☐ Haga usted el diagnóstico | |
| ☐ Carta al editor | ☐ Reseña bibliográfica | |

1- Presentación

- ☐ Texto escrito a doble espacio en fuente Arial de 12 puntos de tamaño y alineado a la izquierda
- ☐ Páginas numeradas consecutivamente en la esquina inferior derecha

2- Título

- ☐ Se incluyen los títulos en español e inglés (máximo 165 caracteres).
- ☐ Se incluye el título abreviado en español, o inglés en los casos pertinentes (máximo 50 caracteres).
- ☐ Los autores aparecen sólo con su afiliación institucional, sin mencionar cargos ni títulos académicos.
- ☐ El autor de la correspondencia suministró los datos completos: nombre, apellidos, dirección, teléfono, fax y dirección electrónica.

3- Resumen

- ☐ Se incluye el resumen estructurado en español e inglés, con una extensión máxima de 250 palabras y con los siguientes subtítulos: introducción, objetivos, materiales y métodos, resultados y conclusiones.
- El resumen estructurado solo se requiere para artículos originales y comunicaciones breves.

4- Palabras clave

- ☐ Se incluyen 6 a 10 por artículo en cada idioma.
- ☐ Se usan las palabras clave en español e inglés indexadas en los Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS) (<http://decs.bvs.br/E/homepagee.html>) y *Medical Subject Headings* (MeSH) (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm>).

5- Estructura del artículo original, nota técnica y comunicación breve

Se incluyen los siguientes apartados:

- ☐ Introducción
- ☐ Materiales y métodos
- ☐ Resultados
- ☐ Discusión
- ☐ Agradecimientos
- ☐ Declaración de conflicto de intereses

- ___ Financiación
- ___ Referencias
- ___ Cuadros y figuras con sus respectivas leyendas

6- Figuras

- ___ Se incluye cada una en página aparte, con su respectiva leyenda.

7- Cuadros

- ___ Se adjuntan en hoja aparte, elaborados en el modelo de tablas de Word, configurados en Arial 10 a espacio sencillo.
- ___ Se ordenan secuencialmente.
- ___ Se incluye la leyenda correspondiente.

8- Referencias

- ___ Las referencias se numeran según el orden de su aparición en el texto.
- ___ Se ordenan secuencialmente y en el formato adecuado, tal y como lo indican las normas de *Biomédica* en las instrucciones para los autores.
- ___ Cuando se citan referencias en los cuadros, éstas deben seguir el orden que se venía usando en el texto.

9- Abreviaturas y siglas

- ___ Se anotan entre paréntesis después de la primera vez que aparezcan, en forma completa y en el idioma original, los términos que se abrevian. Debe evitarse el uso y la creación de siglas que no sean universalmente reconocidas.

10- Nomenclatura

- ___ Los nombres taxonómicos de género y especie están escritos en letra cursiva.
- ___ Los nombres de microorganismos se escriben completos la primera vez que se citan, incluso en el título y en el resumen; después, se usa solamente la inicial del género y el nombre completo de la especie.

11- Consideraciones generales

- ___ Se envió carta impresa firmada por todos los autores o, en caso de autores radicados en el extranjero, una carta de remisión firmada y escaneada desde sus correos electrónicos personales.
- ___ Se incluyó el formato de declaración de conflicto de interés diligenciado por cada uno de los autores.
- ___ Se obtuvo autorización del Comité de Ética para la experimentación en humanos o animales, la cual debe incluirse al final de la sección de Materiales y métodos.
- ___ Se incluyeron el sitio y el número de registro del ensayo clínico, para la intervención y experimentación en humanos.
- ___ Los autores certifican al Comité Editorial que las personas mencionadas en los agradecimientos tienen conocimiento de dicha mención y están de acuerdo con aparecer en ellos.
- ___ Todos los manuscritos incluyen una declaración sobre la fuente de financiación.
- ___ Se envían los nombres de los cuatro evaluadores nacionales y los cuatro internacionales, con sus respectivos datos (nombre, afiliación institucional y correo electrónico).

Instructions to authors

Scope and policy

Biomédica is the quarterly journal of the *Instituto Nacional de Salud of Colombia* [Colombia's National Institute of Health]. Its main purpose is to publish the results of original research that may contribute to expand knowledge in biomedicine.

Editorial policy

Biomédica accepts and subscribes the guidelines established by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) (www.icmje.org), by the Equator Network (<http://www.equator-network.org/>) and by the Committee on Publication Ethics (COPE) (<http://publicationethics.org/>) in order to guarantee the quality of scientific publications, their transparency, integrity and full compliance with the ethical principles applicable to biomedical research.

Biomédica's policy on authorship adheres to the ICMJE guidelines, which state in this regard that:

"Authorship should be based solely on the following:

- 1) Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work;
- 2) drafting the work or revising it critically for important intellectual content;
- 3) final approval of the version to be published, and
- 4) responsibility for all aspects of the manuscript to ensure that matters concerning accuracy and completeness of any of its sections have been appropriately investigated and solved.

All authors should meet these four conditions. Fund raising, data collection or general supervision of the research group do not justify authorship."

Biomédica will not accept the inclusion or withdrawal of any author from the original list once the manuscript has started the editorial process. In exceptional, applicable cases, it will be mandatory to obtain written consent of the author(s) whose name(s) are to be removed from or added to the manuscript. Besides, written consent should be sent stating that all authors meet authorship criteria, and that there are no other authors who meet these criteria and are not mentioned. The document should also describe in detail the contribution of each participant to the research work and to the article.

Clinical trials registration

Biomédica subscribes the policies of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journals Editors (ICMJE) regarding clinical trials registration. Therefore, it will accept for publication only those manuscripts on clinical research exhibiting the identification number from one of the clinical trial registries validated according to the criteria established by WHO and the ICMJE. The identification number and place of registry should be mentioned after the Abstract.

Copyright notice

No national or foreign publication may reproduce or translate articles or abstracts from *Biomédica* without previous written authorization by the Editorial Board.

Privacy statement

The names and e-mail addresses provided to *Biomédica* will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.

Editorial process

All manuscripts submitted for publication to *Biomédica* will be reviewed by the Editorial Board and sent for peer review to at least two experts. To facilitate this process, authors must suggest and send via the journal on-line platform the names, institutional affiliation and e-mail addresses of four national and four international reviewers whose names should not be included in the manuscript.

Once the authors receive the reviewers' comments, they must address each comment, in addition to incorporating the corresponding modifications in the text. The authors must reply to the reviewer comments within two weeks after receiving them; if *Biomédica* has not received the authors' reply during the following four weeks, the paper will be withdrawn.

Once the paper has been accepted for publication, the Editorial Board will not accept modifications in its content, and it will request a copyright transfer statement signed by all authors. Additionally, authors should certify the quality of the English language in the manuscript or in the abstract on a document signed by an expert and sent to the journal before two weeks.

The original manuscripts of articles accepted to be published will remain in the journal files for a minimum of one year after publication. Once the paper has been accepted for publication, and after editing and style correction, authors will receive the galley proofs, which must be carefully reviewed and returned to the editors within 48 hours after receipt by the authors.

Once the paper has been published, the corresponding author will receive five free copies of the journal issue.

Biomédica is an open access journal and it includes citation metadata for all references in published articles, all of which are deposited in CrossRef (<http://www.crossref.org/>).

General information on manuscripts

Biomédica will publish scientific papers written in Spanish or English, in the following categories:

Original articles: Unpublished manuscripts resulting from biomedical research which present new information about specific aspects and provides a relevant contribution to scientific knowledge.

Short communication: Report of partial or final results of research whose rapid disclosure is of great importance.

Technical note: Detailed description of a new laboratory technique or of modifications done to an established technique, emphasizing the advantages that the process has, or the importance of the innovation developed.

Essay: A philosophical, literary, or scientific manuscript that presents an author's documented opinion about a specific topic or a topic of current interest.

Commentary: A manuscript about an article published in the journal.

History: A manuscript that places emphasis on historical personalities or facts, and their contributions to the development of biomedical sciences or health policies.

Topic review: the current state of the art on a specific topic; it includes two categories:

- 1) Requested by the Editorial Board to experts on a topic.
- 2) Presented by professionals interested in a particular topic. For this option, authors must send a proposal indicating why the topic selected is relevant to the readers of *Biomédica* including a brief description, some key references,

publications by the authors on the topic that are to be cited (mandatory), unpublished data by the authors that are to be included (mandatory), the probable size of the manuscript and the approximate number of illustrations.

In both categories, authors should include the following elements:

- An abstract with emphasis on the significance of recent findings;
- a pointed introduction to the topic showing past landmarks and present developments;
- appropriate subtitles to facilitate a better understanding of the manuscript;
- the development of the topic is left to the discretion of the authors, but they are advised to include tables, graphics and figures to provide a clearer understanding of the text. In case figures are taken partially or totally from other publications, authors must attach the permission from the copyright holder for their reproduction in *Biomédica*.

Images in biomedicine: An illustrated paper with photographs demonstrating and explaining a concept, a structure, a disease or a biomedical diagnosis. It must include a short commentary emphasizing the importance of the illustrated topic.

Make your own diagnosis: The purpose of papers presented in this category is to challenge the diagnostic ability of readers, using illustrations or photographs of clinical data, or microscopic findings. It has two parts, the clinical presentation and the corresponding findings in the first part, and the correct diagnosis in the second part. The latter should appear on a separate page and with an updated comment on the disease it highlights.

Case presentation: Clinical cases with peculiar presentations or special features of diagnostic value and a brief review of the relevant literature.

Letters to the editor: Readers can request explanations or comment on articles published in the journal. The decision to publish these letters lies on the Editorial Board.

Book review: Brief critical writings on books about health and biomedicine.

Preparation of the manuscript

Please follow the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors that are published as "Recommendations for the Conduct,

Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals" (updated December 2013) (<http://icmje.org/icmje-recommendations.pdf>).

The manuscript must include the following sections:

Presentation page: This section must include the following items:

- Manuscript title (maximum 165 characters)
- Running title for page headlines (maximum 50 characters)
- Spanish title (maximum 165 characters)
- A paragraph with the authors' full names (include only first family name)
- The institutional affiliation of each author including the name of their group, institution, city and country. The link of authors' names and institutional affiliation should be done using numbers in superscript. Omit positions held and academic qualifications.
- Name of corresponding author, along with postal address, telephone and fax numbers and e-mail address
- A paragraph stating authors' specific contribution to the article.

Abstracts: The manuscript must include a structured abstract (introduction, objective, materials and methods, results and conclusions) in both Spanish and English, not longer than 250 words. The use of references is not allowed in the abstract, and the inclusion of abbreviations and acronyms is not recommended.

Key words: No more than ten key words in each language are permitted. Authors are advised to verify the English keywords in the Medical Subject Headings (MeSH) of the Index Medicus available from <http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm>, and the Spanish keywords in *Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS)* of the Latin American and Caribbean Health Sciences index available from <http://decs.bvs.br>

Text: All manuscripts, including the presentation page, abstracts, references, tables and titles of figures and tables, should be in double space. Leave only a single space after the end of each paragraph. Use Arial font size 12 for the text and for table and figure titles, and do not justify the text (left justified). Use italic letters for species names or scientific terms; do not underline for italicization.

Electronic format: The manuscript must be received as an MS Word™ file, preferably in the 97-2003 version. Figures should come attached to the Word document and they should be sent preferably in a 300 dpi tiff format. Graphics made with Power Point™ or MS Word programs are not acceptable because of low resolution. Illustrations are printed in a single column (75 mm) or in two columns (153 mm), therefore, illustrations must be sent in one of these two print sizes. In the case of color illustrations, please use CMYK files in a high resolution tiff format. The best resolution for CMYK files is 300 dpi if the image does not include text. If the image includes text, the recommended resolution is 600 dpi; if it is black and white, the recommended resolution is 1200 dpi. The recommended font for graphics is Helvetic. If your files are Macintosh, please convert them to one of the above formats. A complete list of the files must be sent including the names of the programs in which they were formatted.

Acknowledgements: Authors should certify that persons mentioned in the Acknowledgements have been informed and they have agreed to it. This is not required in the case of institutions.

Conflicts of interest and financial support statements: Authors must place these statements before the References section in separate paragraphs.

Biomédica subscribes the ICMJE recommendations in this respect and adopts their format for the statement of potential conflicts of interest, which should be filled out individually by each author and sent along with the letter of submission. The electronic format is available from <http://www.icmje.org/conflicts-of-interest/>.

References: Strict adherence to the guidelines of the uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals is required. A number is assigned to each reference as it appears in the manuscript, the tables and figures in ascending order. The reference numbers are placed within parenthesis (not as indices or superscripts).

Personal communications, unpublished data, manuscripts in preparation or submitted for publication, and abstracts presented at congresses or other scientific meetings must not be numbered but rather referenced in the text within parenthesis.

Consult the periodical publications list of Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/tsd7serials7lij.html>) for exact abbreviations of journal names. If the

journal is not listed, write its full title. Include only the first six authors of the article, followed by *et al.* The inclusion of national and Latin-American references is recommended. For this purpose, please consult Lilacs, Latindex, Sibra, or Colciencia's indices, and other pertinent bibliographic sources.

The following are some examples of references from different types of publications according to the Vancouver style.

Scientific journal: The adequate way of citing scientific journals is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title. Journal's abbreviated name. Year;volume:initial page-last page. <http://dx.doi.org/>

Examples:

Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294:15-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.008>

Sánchez J, Villada OA, Rojas ML, Montoya L, Díaz A, Vargas C, et al. Efecto del zinc aminoquelado y el sulfato de zinc en la incidencia de la infección respiratoria y la diarrea en niños preescolares de centros infantiles. *Biomédica*. 2014;34:79-91. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1581>

Book or document: The adequate way of citing books or documents is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title. Edition (when applicable). Place of publication: Publisher; year. Initial page-last page or total number of pages.

Example:

Bernard HR. Research methods in anthropology: Qualitative and quantitative approaches. Second edition. Thousand Oaks, CA: Sage Publications; 1994. 585 p.

Book chapter or document: The adequate way of citing book chapters or documents is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title of chapter. In: name of book author(s), editor(s). Title of book. Edition (when

applicable). Place of publication: Publisher; year. Initial page - last page or total number of pages.

Example:

Restrepo A, Tobón AM, Agudelo CA. Paracoccidioidomycosis. In: Hospenthal DR, Rinaldi MG, editors. *Diagnosis and treatment of human mycoses*. 1st edition. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 127-331.

Documents in web sites: The adequate way of citing documents published in web sites is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title. Citation date: day, month, year. Available from: exact link to open the document.

Example:

Nucci M, Colombo AL. Clinical manifestations and diagnosis of acute/subacute paracoccidioidomycosis. UpToDate. 2012. Citation date: October 15, 2012. Available from: <http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-acute-subacute-paracoccidioidomycosis>.

Tables and figures: Tables must be formatted using the Word processing tool for this purpose. Do not include columns or tabulations within the text of the manuscript.

Regarding microscope slides, include the staining and lens increase in the objective, but do not include the value of the ocular.

In the case of tables or figures previously published, an authorization by the copyright holder should be attached for publication in *Biomédica*.

Manuscript submission

The manuscript should be submitted to *Biomédica*'s on-line platform using the link "*Información para autores*", available from <http://www.revistabiomedica.org/>. However, a printed letter signed by all authors stating that they know the contents of the manuscript, that they agree to its submission for publication in *Biomédica*, and explicitly stating that the manuscript has not been published or submitted for publication to any other journal should be sent to the following address:

Revista Biomédica
Instituto Nacional de Salud
Avenida Calle 26 No. 51-20, bloque B, oficina B-245
Bogotá D.C., Zona 6, Colombia

Authors living in foreign countries may send the letter signed and scanned via e-mail to *Biomédica*'s e-mail: biomedica@ins.gov.co, explaining that they do so because they are settled abroad.

Once the printed letter of submission (in the case of local authors), or the e-mails (in the case of authors abroad) have been received at *Biomédica*'s office, the editorial review process will start.

The submission of a manuscript to *Biomédica* for publication implies the acceptance by the authors of the following:

- Full knowledge and strict adherence to the instructions to authors;
- compliance with the internationally accepted authorship criteria;
- inclusion of all authors that meet authorship criteria;
- total agreement with the final version of the manuscript submitted for publication, and
- no engagement in any conduct that may be considered a transgression of the scientific integrity or the ethical principles of scientific publications.

Checklist for submitted manuscripts

For the purpose of verifying that authors have complied with *Biomédica's* publication guidelines, the corresponding author should include the following checklist along with the manuscript:

Category

- | | | |
|---|--|---|
| ☐ Original article | ☐ Short communication | ☐ Technical note |
| ☐ Topic review | ☐ Historical paper | ☐ Essay |
| ☐ Commentary | ☐ Images in biomedicine | |
| ☐ Case presentation | ☐ Make your own diagnosis | |
| ☐ Letter to the editor | ☐ Book review | |

1. Presentation

- ☐ Text written in double space, in Arial font size 12 point, on one side of letter-size pages
- ☐ Pages numbered consecutively

2. Title

- ☐ Title in Spanish and English (maximum 165 characters)
- ☐ Running title in the same language used in the text of the manuscript (Spanish or English, maximum 50 characters)
- ☐ Authors' names with institutional affiliations (do not include current positions or academic titles)
- ☐ Corresponding author's information: name, postal address, phone number, fax number, e-mail address

3. Abstracts

- ☐ Structured abstract both in Spanish and English (maximum 250 words) using the following subtitles: Introduction, Objective(s), Materials and methods, Results, Conclusion(s). The inclusion of a structured abstract applies only for original articles and short communications.

4. Keywords

- ☐ 6 to 10 per manuscript in each language
- ☐ Keywords in English previously verified in the Medical Subject Headings (MeSH) of Index Medicus available from <http://www.nlm.nih.gov/mesh7meshhome.htm>, and Spanish keywords verified in *Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS)* of the Latin American and Caribbean Health Sciences index available from <http://decs.bvs.br>

5. Structure of an original article, technical note or short communication

Include the following sections:

- ☐ Introduction
- ☐ Materials and methods
- ☐ Results
- ☐ Discussion
- ☐ Acknowledgements
- ☐ Conflicts of interest statement
- ☐ Financial support statement

___ References

___ Tables and figures with their corresponding titles.

6. Figures

___ Figures should go on a separate page with its corresponding title

7. Tables

___ Tables should go on a separate page, in Word format using font Arial size 10 and single space

___ Tables should be numbered consecutively in their order of appearance in the text

___ Include titles for all tables and figures.

8. References

___ References should be numbered consecutively according to the order of citation in the text.

___ *Biomedica*'s guidelines for citing references must be followed strictly.

___ If references are cited in tables or figures, please continue with the consecutive order used in the text.

10. Use of abbreviations and acronyms

___ Write the complete term in its original language with the corresponding abbreviation in parenthesis.
Avoid using abbreviations and acronyms that are not universally accepted.

11. Nomenclature

___ Names of genus and species are written in italics

___ Microorganisms scientific names should be written in full the first time they appear in the text, as well as in the title and in the abstracts; after, just use the first letter of the genus followed by a dot and the complete name of the species.

12. General considerations

___ Printed letter of submission signed by all authors. In the case of authors living abroad, the letter should be signed, scanned and sent from their personal e-mails.

___ Conflicts of interest statement in the corresponding form filled out by each author.

___ Manuscripts presenting results from research conducted on human subjects or animals include an explicit statement that ethical clearance was requested and obtained from an institutional ethics committee. This statement goes at the end of the Materials and methods section.

___ Site and registration number for clinical trials in human subjects.

___ Authors certify that the persons whose names are mentioned in the Acknowledgements section are fully aware of this and agree to their inclusion.

___ The financial support statement was included.

___ The names, institutional affiliation and e-mails of the four national and four international reviewers suggested by the authors were included in the letter of submission.

