A detailed close-up photograph of a scorpion's pincers (pedipalps) and several pairs of legs. The pincers are dark, almost black, with a prominent, curved, reddish-brown tip. The legs are a lighter, brownish-tan color with numerous small, dark spots and fine hairs. The scorpion is positioned on a rough, porous, light-colored substrate, possibly a piece of wood or bark, which is partially visible in the foreground and background. The background is a plain, light color, making the scorpion stand out.

ISSN 0120-4157

# Biomédica

**Revista del Instituto Nacional de Salud**

Volumen 37, No. 2 - Junio de 2017

Bogotá, D.C., Colombia, S.A.

**Portada:** Gota de veneno del escorpión *Tityus macrochirus*; este veneno es secretado por el par de glándulas apocrinas ubicadas en el telson, y expulsado por el aguijón como respuesta al estímulo eléctrico.

Laboratorio del Grupo de Investigación en Proteínas (GRIP), Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C, Colombia.

Fotografía, edición digital y diseño: David A. Hernández-Mora, Bogotá, D.C, Colombia

# Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 37, No. 2 - Bogotá, D.C., Colombia - Junio de 2017

---

## 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

MIGUEL A. GUZMÁN  
Investigador Emérito  
Instituto Nacional de Salud  
Bogotá, D.C., Colombia

NANCY GORE SARAVIA  
Centro Internacional de Entrenamiento  
e Investigaciones Médicas  
Cali, Colombia

RAÚL PARDO  
Instituto Nacional de Salud  
Bogotá, D.C., Colombia

LEONARD MUNSTERMANN  
Yale University School of Medicine  
New Haven, CT, Estados Unidos

GUSTAVO C. ROMÁN  
Methodist Neurological Institute  
Houston, TX, Estados Unidos

OMAR SEGURA  
Federación Médica Colombiana  
Bogotá, D.C., Colombia

ORLANDO TORRES-FERNÁNDEZ  
Instituto Nacional de Salud  
Bogotá, D.C., Colombia

---

## Comité Científico

ARNOLDO BARBOSA  
Universidad del Tolima  
Ibagué, Colombia

ANTONIO BERMÚDEZ  
Instituto Nacional de Salud  
Bogotá, D.C., Colombia

JORGE H. BOTERO  
Universidad de Antioquia  
Medellín, Colombia

VÍCTOR CÁRDENAS  
University of Texas  
El Paso, TX, Estados Unidos

ALBERTO CONCHA-EASTMAN  
Guatapé, Colombia

ZOILO CUÉLLAR  
Academia Nacional de Medicina  
Bogotá, D.C., Colombia

LUIS GABRIEL CUERVO  
Organización Panamericana  
de la Salud  
Washington, D.C., Estados Unidos

PATRICIA DEL PORTILLO  
Corpogén  
Bogotá, D.C., Colombia

ANDRÉS DE FRANCISCO  
Organización Mundial de la Salud  
Ginebra, Suiza

FERNANDO DE LA HOZ  
Universidad Nacional de Colombia  
Bogotá, D.C., Colombia

JOSÉ LUIS DI FABIO  
Organización Panamericana de la Salud  
Washington, D.C., Estados Unidos

JORGE HERNANDO DONADO  
Universidad Pontificia Bolivariana  
Medellín, Colombia

JOSÉ FIGUEROA  
World Health Organization  
Ginebra, Suiza

LUIS FERNANDO GARCÍA  
Universidad de Antioquia  
Medellín, Colombia

ALBERTO GÓMEZ  
Pontificia Universidad Javeriana  
Bogotá, D.C., Colombia

ENRIQUE GONZÁLEZ  
University of Texas Health Science Center  
at San Antonio  
San Antonio, TX, Estados Unidos

JOHN MARIO GONZÁLEZ  
Universidad de los Andes  
Bogotá, D.C., Colombia

FELIPE GUHL  
Universidad de los Andes  
Bogotá, D.C., Colombia

ANTONIO IGLESIAS  
Universidad Nacional de Colombia  
Bogotá, D.C., Colombia

JORGE JARA  
Centers for Disease Control and  
Prevention, Regional Office for  
Central America and Panama,  
CDC-CAP  
Ciudad de Guatemala, Guatemala

ERNESTO JARAMILLO  
Organización Mundial de la Salud  
Ginebra, Suiza

MARCELO LABRUNA  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, Brasil

JAIRO LIZARAZO  
Hospital Universitario Erasmo  
Meoz  
Cúcuta, Colombia

JUAN GUILLERMO McEWEN  
Corporación para Investigaciones  
Biológicas  
Medellín, Colombia

ROBERTO MENDOZA  
The Hospital for Sick Children  
Toronto, Ontario, Canada

ÁLVARO MONCAYO  
Universidad de los Andes  
Bogotá, D.C., Colombia

RICARDO NEGRONI  
Hospital de Infecciosas  
Francisco Javier Muñiz  
Buenos Aires, Argentina

MARÍA TERESA OCHOA  
University of California Los Ángeles  
Los Ángeles, CA, Estados Unidos

JUAN P. OLANO  
University of Texas Medical Branch  
Galveston, TX, Estados Unidos

BLANCA RESTREPO  
University of Texas  
Brownsville, TX, Estados Unidos

VÍCTOR E. REYES  
University of Texas Medical Branch  
Galveston, TX, Estados Unidos

PEDRO ROMERO  
Ludwig Center for Cancer Research  
University of Lausanne  
Lausana, Suiza

GERZAÍN RODRÍGUEZ  
Investigador Emérito  
Instituto Nacional de Salud  
Universidad de la Sabana  
Bogotá, D.C., Colombia

ÁLVARO RUIZ  
Pontificia Universidad Javeriana  
Bogotá, D.C., Colombia

GIOCONDA SAN BLAS  
Instituto Venezolano de  
Investigaciones Científicas  
Caracas, Venezuela

ÁLVARO SANABRIA  
Hospital Pablo Tobón Uribe  
Universidad de Antioquia  
Medellín, Colombia  
Universidad de la Sabana  
Chía, Colombia

RICARDO SÁNCHEZ  
Universidad Nacional de Colombia  
Bogotá, D.C., Colombia

ROBERT TESH  
University of Texas  
GALVESTON, TX, ESTADOS UNIDOS

BRUNO TRAVI  
University of Texas  
Galveston, TX, Estados Unidos

GUSTAVO VALBUENA  
University of Texas  
Galveston, TX, Estados Unidos

JUAN MIGUEL VILLALOBOS  
Universidade Federal de Rondônia  
Porto Velho, Brasil

MOISÉS WASSERMAN  
Investigador Emérito  
Instituto Nacional de Salud  
Universidad Nacional de Colombia  
Bogotá, D.C., Colombia

---

CARLOS ARTURO HERNÁNDEZ  
Edición y corrección de estilo

LINDA GRACE MOLANO  
Asistencia editorial

MARTHA RENZA  
Corrección de estilo

ELIZABETH GUZMÁN  
Mercadeo digital

JOHANNA MORALES  
Diagramación

---

© Instituto Nacional de Salud

La revista *Biomédica* del Instituto Nacional de Salud es una publicación trimestral, eminentemente científica. Está amparada por la resolución número 003768 de 1981, emanada del Ministerio de Gobierno, y con tarifa postal reducida según resolución número 1128 del 5 de mayo de 1982.

Ninguna publicación, nacional o extranjera, podrá reproducir ni traducir sus artículos ni sus resúmenes sin previa autorización escrita del editor. Ni la revista, ni el Instituto asumen responsabilidad alguna por los puntos de vista expresados por los autores. La revista no publicará ningún tipo de propaganda comercial. Los nombres de equipos, materiales y productos manufacturados que eventualmente puedan mencionarse, no implican recomendación ni propaganda para su uso y sólo se mencionan como identificación genérica.

La revista *Biomédica* aparece reseñada en *Index Medicus/Medline de la National Library of Medicine*, en el *Science Citation Index Expanded (also known as SciSearch®)* y *Journal Citation Reports/Science Edition de Thomson Scientific*, en *SciELO Colombia (Scientific Electronic Library Online)*, en el índice de la *Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud (LILACS)*, en la Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (*RedAlyC*), en el *Índice Mexicano de Revistas Biomédicas Latinoamericanas (Imbiomed)*, en *Scopus* de Elsevier B.V., en el *Sistema de Información Bibliográfica Regional Andina (SIBRA)*, en *CAB Abstracts*, *Review of Medical and Veterinary Entomology*, y forma parte del *Índice Nacional de Publicaciones Seriadas Científicas y Tecnológicas Colombianas* de Colciencias y del *Índice Latinoamericano de Revistas Científicas y Tecnológicas (LATINDEX)*.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD  
Avenida Calle 26 No. 51-20  
Apartado aéreo 80334 y 80080  
Bogotá, D.C., Colombia, S.A.

URL: <http://www.ins.gov.co>  
[biomedica@ins.gov.co](mailto:biomedica@ins.gov.co)

Impresión: Imprenta Nacional de Colombia

## Contenido

### Editorial

- La donación y el trasplante de componentes anatómicos en Colombia: siete décadas de logros  
*Juan Gonzalo López-Casas* ..... 145

### Haga usted el diagnóstico

- Hombre de 66 años con nódulos exulcerados del codo de cuatro años de evolución, primera parte  
*Gerzaín Rodríguez* ..... 147

### Presentación de caso

- Síndrome de hipersensibilidad a medicamentos con exantema, eosinofilia y síntomas sistémicos inducido por carbamazepina  
*Jorge Alonso Marín, Mayra Alexandra Ortega, Isaura Pilar Sánchez, José Armando Pacheco* ..... 150
- Casos de intoxicación aguda por plaguicidas en la colonia Puerto Pirapó, Itapúa, Paraguay, febrero de 2014  
*María Esther Pedrozo, Sandra Ocampos, Rosa Galeano, Andrea Ojeda, Agueda Cabello, Dalva De Assis* ..... 158

### Artículo original

- Rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED para la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes en muestras respiratorias en laboratorios periféricos de Argentina  
*María Imaz, Sonia Allassia, Mónica Aranibar, Alba Gunia, Susana Poggi, Ana Togneri, Lidia Wolff, Group of Implementation of Fluorescence Microscopy* ..... 164
- Supervivencia de receptores de trasplante renal en Colombia, 2008-2012  
*Karime Osorio-Arango, Mauricio Beltrán-Durán, Yazmín Arias-Murillo, Franklyn Prieto, Adriana Robayo* ..... 175
- Determinación del polimorfismo de HLA-A, -B y -DRB1 en donantes de órganos con muerte encefálica representativos de la población general colombiana, 2007-2014  
*Yazmín Arias-Murillo, Karime Osorio-Arango, Brayan Bayona, Guadalupe Ercilla, Mauricio Beltrán-Durán* ..... 184
- Frecuencia de mutaciones de la nitrorreductasa RdxA de *Helicobacter pylori* para la activación del metronidazol en una población del departamento del Cauca, Colombia  
*Claudia Patricia Acosta, Andrés Javier Quiroga, Carlos H. Sierra-Torres, Alba Alicia Trespalacios* ..... 191
- Nueva reacción en cadena de la polimerasa múltiple para el diagnóstico específico de especies implicadas en la candidiasis humana  
*Liliana Torcoroma García, Liany Johanna Luna, Tania Katherine Velasco, Beatriz Elena Guerra* ..... 200
- Diversidad genética de cepas extraintestinales de *Escherichia coli* productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención en salud  
*Yasmin Varela, Beatriz Millán, María Araque* ..... 209

- Posible transmisión oral de la enfermedad de Chagas en trabajadores del sector de los hidrocarburos en Casanare, Colombia, 2014  
*Liliana Patricia Zuleta-Dueñas, Ángela Johana López-Quiroga, Fernando Torres-Torres, Oneida Castañeda-Porras* ..... 218

- Detección de *Mycobacterium tuberculosis*, linaje Beijing, en Ecuador  
*Patricia Jiménez, Karina Calvopiña, Diana Herrera, Carlos Rojas, Laura Pérez-Lago, Marcelo Grijalva, Remedios Guna, Darío García-de Viedma* ..... 233

- Purificación parcial de péptidos presentes en el veneno del escorpión *Tityus macrochirus* (Buthidae) y evaluación preliminar de su actividad citotóxica  
*Clara Andrea Rincón-Cortés, Édgar Antonio Reyes-Montaño, Nohora Angélica Vega-Castro* ..... 238

- Caracterización de pacientes con enfermedades genéticas del esqueleto en un centro colombiano de remisión  
*Harvy Mauricio Velasco, Lina Patricia Buelvas* ..... 250

### Comunicación breve

- Asociación de variantes polimorfas de los genes *PTPN22*, *TNF* y *VDR* en niños con nefritis lúpica: un estudio de tríos en familias colombianas  
*Gloria Garavito, Eduardo Egea, Luis Fang, Clara Malagón, Carlos Olmos, Luz González, Pilar Guarnizo, Gustavo Aroca, Guillermo López, Antonio Iglesias* ..... 260
- Los haplotipos en *CCR5-CCR2*, *CCL3* y *CCL5* se asocian con resistencia natural a la infección por el HIV-1 en una cohorte colombiana  
*Jorge A. Vega, Simón Villegas-Ospina, Wbeimar Aguilar-Jiménez, María T. Rugeles, Gabriel Bedoya, Wildeman Zapata* ..... 267

### Revisión de tema

- Triatoma dimidiata* en Colombia; distribución, ecología e importancia epidemiológica  
*Oscar Quirós-Gómez, Nicolás Jaramillo, Víctor M. Angulo, Gabriel Parra-Henao* ..... 274

### Haga usted el diagnóstico

- Hombre de 66 años con nódulos exulcerados del codo de cuatro años de evolución, segunda parte  
*Gerzaín Rodríguez* ..... 286

### Comentarios bibliográficos

- “Las leishmaniasis: atlas y texto”  
*Miguel A. Guzmán* ..... 290

Instrucciones a los autores

## Contents

### Editorial

- Donation and transplantation of anatomical components in Colombia: Seven decades of achievements  
*Juan Gonzalo López-Casas* ..... 145

### Make your own diagnosis

- A 66-year old man with exulcerated nodules on his left elbow of four years of evolution, part one  
*Gerzaín Rodríguez* ..... 147

### Case presentation

- Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms syndrome induced by carbamazepine: Case report  
*Jorge Alonso Marín, Mayra Alexandra Ortega, Isaura Pilar Sánchez, José Armando Pacheco* ..... 150

- Cases of acute pesticide poisoning in Colonia Puerto Pirapó, Itapúa, Paraguay, February, 2014  
*María Esther Pedrozo, Sandra Ocampos, Rosa Galeano, Andrea Ojeda, Agueda Cabello, Dalva De Assis* ..... 158

### Original articles

- Performance of LED fluorescence microscopy for the detection of acid-fast bacilli from respiratory samples in peripheral laboratories in Argentina  
*María Imaz, Sonia Allasia, Mónica Aranibar, Alba Gunia, Susana Poggi, Ana Togneri, Lidia Wolff, Group of Implementation of Fluorescence Microscopy* ..... 164

- Survival in renal transplant recipients in Colombia, 2008-2012  
*Karime Osorio-Arango, Mauricio Beltrán-Durán, Yazmín Arias-Murillo, Franklyn Prieto, Adriana Robayo* ..... 175

- Determination of HLA-A, -B and -DRB1 polymorphism in brain dead organ donors representative of the Colombian general population, 2007-2014  
*Yazmín Arias-Murillo, Karime Osorio-Arango, Brayan Bayona, Guadalupe Ercilla, Mauricio Beltrán-Durán* ..... 184

- Frequency of *Helicobacter pylori* nitroreductase RdxA mutations for metronidazole activation in a population in the Cauca Department, Colombia  
*Claudia Patricia Acosta, Andrés Javier Quiroga, Carlos H. Sierra-Torres, Alba Alicia Trespalacios* ..... 191

- A new multiplex PCR for species-specific diagnosis of human candidiasis  
*Liliana Torcoroma García, Liany Johanna Luna, Tania Katherine Velasco, Beatriz Elena Guerra* ..... 200

- Genetic diversity of extraintestinal *Escherichia coli* strains producers of beta-lactamases TEM, SHV and CTX-M associated with healthcare  
*Yasmin Varela, Beatriz Millán, María Araque* ..... 209

- Possible oral transmission of Chagas' disease among hydrocarbons sector workers in Casanare, Colombia, 2014  
*Liliana Patricia Zuleta-Dueñas, Ángela Johana López-Quiroga, Fernando Torres-Torres, Oneida Castañeda-Porras* ..... 218

- Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage in Ecuador  
*Patricia Jiménez, Karina Calvopiña, Diana Herrera, Carlos Rojas, Laura Pérez-Lago, Marcelo Grijalva, Remedios Guna, Darío García-de Viedma* ..... 233

- Partial purification of peptides present in the *Tityus macrochirus* (Buthidae) scorpion venom and preliminary assessment of their cytotoxicity  
*Clara Andrea Rincón-Cortés, Édgar Antonio Reyes-Montaño, Nohora Angélica Vega-Castro* ..... 238

- Characterization of patients with skeletal genetic diseases in a Colombian referral center  
*Harvy Mauricio Velasco, Lina Patricia Buelvas* ..... 250

### Brief communication

- Association of polymorphic variants of *PTPN22*, *TNF* and *VDR* genes in children with lupus nephritis: A study in Colombian family triads  
*Gloria Garavito, Eduardo Egea, Luis Fang, Clara Malagón, Carlos Olmos, Luz González, Pilar Guarnizo, Gustavo Aroca, Guillermo López, Antonio Iglesias* ..... 260

- Haplotypes in *CCR5-CCR2*, *CCL3* and *CCL5* are associated with natural resistance to HIV-1 infection in a Colombian cohort  
*Jorge A. Vega, Simón Villegas-Ospina, Wbeimar Aguilar-Jiménez, María T. Rugeles, Gabriel Bedoya, Wildeman Zapata* ..... 267

### Topic review

- Triatoma dimidiata* in Colombia: Distribution, ecology and epidemiological importance  
*Óscar Quirós-Gómez, Nicolás Jaramillo, Víctor M. Angulo, Gabriel Parra-Henao* ..... 274

### Make your own diagnosis

- A 66-year old man with exulcerated nodules on his left elbow of four years of evolution, part two  
*Gerzaín Rodríguez* ..... 286

### Book review

- "Las leishmaniasis: atlas y texto"  
*Miguel A. Guzmán* ..... 290

Instructions for authors

## Editorial

### **La donación y el trasplante de componentes anatómicos en Colombia: siete décadas de logros**

El trasplante de componentes anatómicos es un procedimiento terapéutico que ha marcado la historia de la medicina desde el siglo pasado. Afortunadamente, Colombia no se ha quedado atrás frente a este avance en salud y, desde mediados del siglo pasado, emprendió un camino de logros científicos, institucionales y normativos.

El primer trasplante de córnea en el país se hizo en 1946, en el Hospital San Juan de Dios. Posteriormente, se hicieron trasplantes de válvulas cardíacas (1959, Clínica Shaio), de riñón (1966, Hospital San Juan de Dios), de hígado (1979, Hospital Universitario San Vicente de Paúl), de corazón (1985, Clínica Santa María), de hueso (1986, Hospital San Ignacio), de páncreas (1988, San Pedro Claver), de pulmón (1997, Clínica Santa María) y de laringe (2002, Universidad de Antioquia/Hospital Universitario San Vicente de Paúl), entre otros procedimientos (1), lo cual refleja una tradición científica relevante consolidada a lo largo de los últimos 70 años.

En cuanto a la normativa, la donación y los trasplantes se han reglamentado mediante la adopción de diversas leyes, especialmente las relacionadas con la donación, el traspaso y la recepción de órganos, tejidos o líquidos orgánicos utilizables con fines terapéuticos (Ley 9 de 1979) (2); la presunción legal de donación como mecanismo de donación, así como la prohibición del lucro en este campo (Ley 73 de 1988) (3); la tipificación del delito de tráfico de órganos (Ley 919 de 2004) (4) y la modificación de las leyes 79 y 919 con el objetivo de ampliar la presunción de donación de componentes anatómicos para trasplantes u otros usos terapéuticos (Ley 1805 de 2016) (5). En cuanto a la cobertura en el sistema de salud, con la Ley 100 de 1993 los trasplantes de córnea, médula ósea, riñón y corazón se incluyeron en el plan de beneficios y, posteriormente, se agregaron los de hígado (6).

Las condiciones para la donación y el trasplante se establecieron mediante el decreto 2493 de 2004, el cual definió la regulación “para la obtención, donación, preservación, almacenamiento, transporte, destino y disposición final de componentes anatómicos y los procedimientos de trasplante o implante de los mismos en seres humanos”, así como la operación de la Red de Donación y Trasplantes a cargo del Instituto Nacional de Salud, responsable de la coordinación del sistema de información, la lista de espera, la asignación de componentes anatómicos de acuerdo con la priorización que se debe dar a los nacionales y extranjeros residentes en el país, y de los conceptos y certificados para el ingreso y salida de tejidos (7). A partir de la creación de dicha Red, se establecieron unidades regionales de coordinación para mejorar los procesos de donación y trasplante y se asignó al Instituto la coordinación y el control de los procesos.

En el ámbito internacional, Colombia le solicitó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) el apoyo para definir la regulación de los trasplantes. Como resultado de este ejercicio, en la 57ª Asamblea de la OMS se presentó un informe sobre la situación de los trasplantes de órganos y tejidos en el mundo, documento que sirvió de base para avanzar en la reorganización institucional en el país (8).

Uno de los puntos críticos de dicha reorganización fue el turismo de trasplantes, es decir, la llegada de extranjeros a nuestro territorio con el objetivo de obtener la donación de un componente anatómico y hacerse el trasplante lo más pronto posible, situación motivada por el prestigio internacional de algunas de nuestras clínicas y hospitales. Afortunadamente, esta anomalía se superó: de 16,5 % trasplantes que

se hacían a pacientes extranjeros no residentes en el 2005, se pasó a cero en el 2015 (9). Cabe resaltar que en el 2009 la Red/Consejo Iberoamericano de Donación y Trasplante (10) reconoció el gran trabajo realizado por el equipo de la Red para eliminar dicha anomalía.

En el 2016 se hicieron en nuestro país 1.059 trasplantes, 70 % de ellos de riñón, 21 % de hígado y 5,5 % de corazón; el porcentaje restante, 3,5 %, correspondió a trasplantes de pulmón, riñón e hígado, riñón y páncreas, intestino y corazón y riñón. En cuanto a la donación, en ese año la tasa de donantes fue de siete por millón de habitantes. Infortunadamente, en los últimos años esta tasa ha tendido a disminuir, pero se espera que gracias a lo dispuesto en la Ley 1805 de 2016, la donación de órganos y tejidos aumente.

A lo largo de las pasadas siete décadas se construyó en Colombia un marco institucional que le ha permitido a la población acceder a diferentes tipos de trasplantes de órganos y tejidos y que, además, ha fortalecido la capacidad técnica y científica de los grupos de trasplantes, y ha eliminado fenómenos como el turismo de trasplantes. Sin embargo, los desafíos futuros no son deleznable. Es necesario consolidar los logros, mantener la eliminación del turismo de trasplantes, aumentar la donación altruista, fortalecer aún más las instituciones encargadas y mejorar el acceso a los trasplantes. No obstante, el mayor reto en los próximos años será el desarrollo de órganos y tejidos bioartificiales (11), un avance que revolucionará no solo la donación sino el proceso de trasplante, así como el marco normativo y bioético, el financiamiento, la terapéutica posterior a las intervenciones y el marco institucional.

Juan Gonzalo López-Casas  
Exdirector, Instituto Nacional de Salud

## Referencias

1. **López J.** Un imperativo en donación de órganos y tejidos: 20 por millón para el año 2011. *Vía Salud.* 2009;47:22-7.
2. **Congreso de Colombia.** Ley 9 de 1979. Por la cual se dictan medidas sanitarias. Fecha de consulta: 21 de abril de 2017. Disponible en: <http://www.redlactea.org/wp-content/uploads/decretos/L9.pdf>.
3. **Congreso de Colombia.** Ley 73 de 1988. Por la cual se adiciona la Ley 09 de 1979 y se dictan otras disposiciones en materia de donación y trasplante de órganos y componentes anatómicos para fines de trasplantes u otros usos terapéuticos. Fecha de consulta: 21 de abril de 2017. Disponible en: <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=14524>.
4. **Congreso de Colombia.** Ley 919 de 2004. Por medio de la cual se prohíbe la comercialización de componentes anatómicos humanos para trasplante y se tipifica como delito su tráfico. Fecha de consulta: 21 de abril de 2017. Disponible en: <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=15507>.
5. **Congreso de Colombia.** Ley 1805 de 2016. Por medio de la cual se modifican la ley 73 de 1988 y la ley 919 de 2004 en materia de donación de componentes anatómicos y se dictan otras disposiciones. Fecha de consulta: 21 de abril de 2017. Disponible en: <http://es.presidencia.gov.co/normativa/normativa/LEY%201805%20DEL%2004%20DE%20AGOSTO%20DE%202016.pdf>.
6. **Congreso de Colombia.** Ley 100 de 1993. Por la cual se crea el sistema de seguridad social integral y se dictan otras disposiciones. Fecha de consulta: 21 de abril de 2017. Disponible en: [http://www.secretariassenado.gov.co/senado/basedoc/ley\\_0100\\_1993.html](http://www.secretariassenado.gov.co/senado/basedoc/ley_0100_1993.html).
7. **Ministerio de la 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. Fecha de consulta: 21 de abril de 2017. Disponible en: [https://www.minsalud.gov.co/Normatividad\\_Nuevo/DECRETO%202493%20DE%202004.pdf](https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/DECRETO%202493%20DE%202004.pdf).
8. **Organización Mundial de la Salud.** 57a. Asamblea Mundial de la Salud-OMS. Trasplante de órganos y tejidos humanos. Informe de la Secretaría. Fecha de consulta: 20 de abril de 2017. Disponible en: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA57/A57\\_17-sp.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA57/A57_17-sp.pdf).
9. **Instituto Nacional de Salud.** Informe anual Red de Donación y Trasplantes, Colombia 2015. Fecha de consulta: 21 de abril de 2017. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadisticas/Informe%20Red%20de%20Donaci%C3%B3n%20y%20Trasplante%202015.pdf>.
10. **Red/Consejo Iberoamericano de Donación y Trasplante.** Declaración de Bogotá. Fecha de consulta: 21 de abril de 2017. Disponible en: <https://www.minsa.gob.pe/portada/Especiales/2008/organos/archivos/RedConsejoIberoamerican.pdf>
11. **Lucea J, Tudela J, Sánchez J.** Producción de órganos bioartificiales. *Cuadernos de Bioética.* 2015; XXVI. Fecha de consulta: 21 de abril de 2017. Disponible en: <http://aebioetica.org/revistas/2015/26/86/149.pdf>.

HAGA USTED EL DIAGNÓSTICO

## Hombre de 66 años con nódulos exulcerados del codo de cuatro años de evolución

### Primera parte

Gerzaín Rodríguez

Grupo de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia

Se trata de un hombre de 66 años con pápulas y nódulos en el codo izquierdo, de cuatro años de evolución, y adenopatía epitroclear de 1 cm de diámetro, móvil y no dolorosa (figura 1). Se tomaron biopsias de dos nódulos y de la adenopatía.

En las biopsias de piel se observó una lesión intradérmica bien circunscrita, sin penetración en la hipodermis, exulcerada (figura 2A). La lesión estaba constituida por masas de células fusiformes, sin atipia, acompañadas de algunos histiocitos vacuolados y de escasas células gigantes de tipo Touton (figura 2, B y C). Se detectaron ocasionales plasmocitos entre las células fusiformes (figuras 2C y 3). En la superficie de la lesión había conglomerados importantes de leucocitos polimorfonucleares y áreas de necrosis (figura 2). En la profundidad de la lesión, además de las células fusiformes, se observó fibrosis e infiltrado rico en plasmocitos, que rodeaban nervios del límite dermo-hipodérmico, algunos con perinervio mal definido (figura 4). En los bordes laterales de la lesión y en su porción profunda, se observaron conglomerados de macrófagos vacuolados y epitelioides con pocas células gigantes (figura 5).

Con estos datos observados, se podía sugerir que el paciente tenía:

- A. fibroxantomas,
- B. dermatofibromas,
- C. lepromas histioides, o
- D. tumores fusocelulares.

Se realizaron coloraciones de Ziehl-Neelsen (ZN) y de ácido peryódico de Schiff (PAS), que demostraron abundantes bacilos en masas intracelulares (figura

#### Correspondencia:

Gerzaín Rodríguez, Grupo de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Campus del Puente del Común, Km 7 Autopista Norte de Bogotá, Chía, Colombia  
Teléfono: (571) 861 5555, extensión 23339; fax (571) 861 5555, extensión 2626  
[gerzainrodriguez@gmail.com](mailto:gerzainrodriguez@gmail.com)

Recibido: 26/05/16; aceptado: 05/10/16



Figura 1. Pápulas y nódulos exulcerados en el codo izquierdo

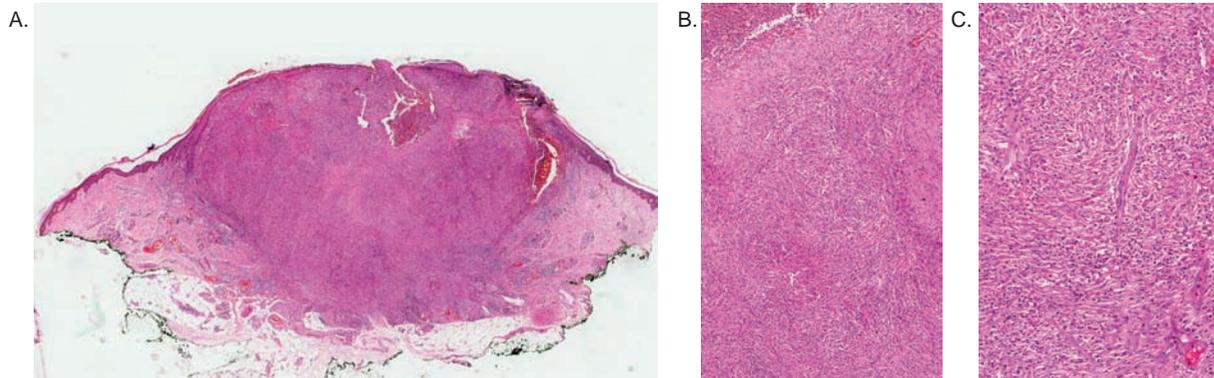
6). El ganglio linfático se presentaba ampliamente reemplazado por infiltrados semejantes, con mayor abundancia de histiocitos de citoplasma vacuolado que contenían abundantes bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) (figura 7).

Con estos resultados, se podía concluir que el paciente tenía:

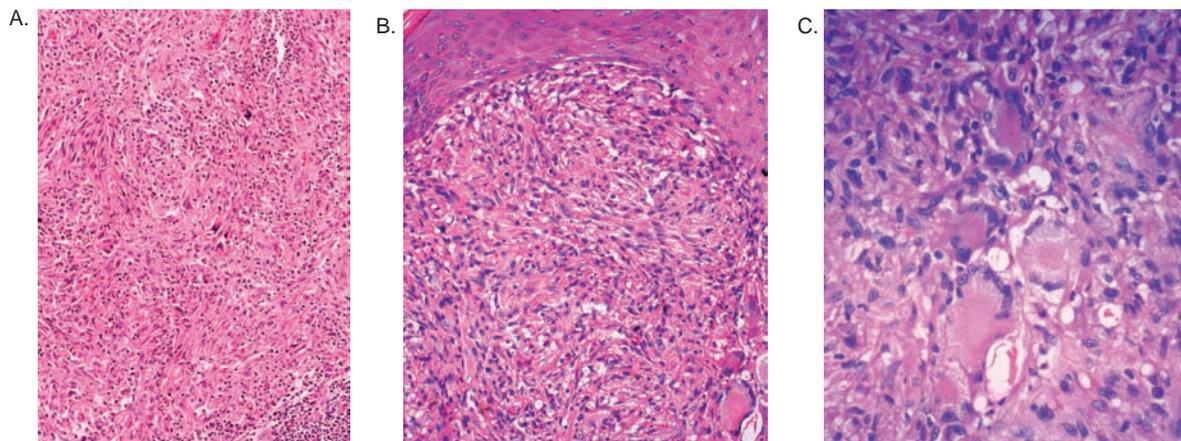
- A. lepra lepromatosa,
- B. lepromas histioides,
- C. cualquiera de los anteriores, o
- D. ninguna de los anteriores.

Se sugirieron los diagnósticos histológicos de lepra lepromatosa y de inflamación por micobacterias atípicas. En la revisión de los cortes se encontró que los nervios estaban bien preservados y que no contenían BAAR (figuras 4 y 6D). Estos datos permitían concluir que:

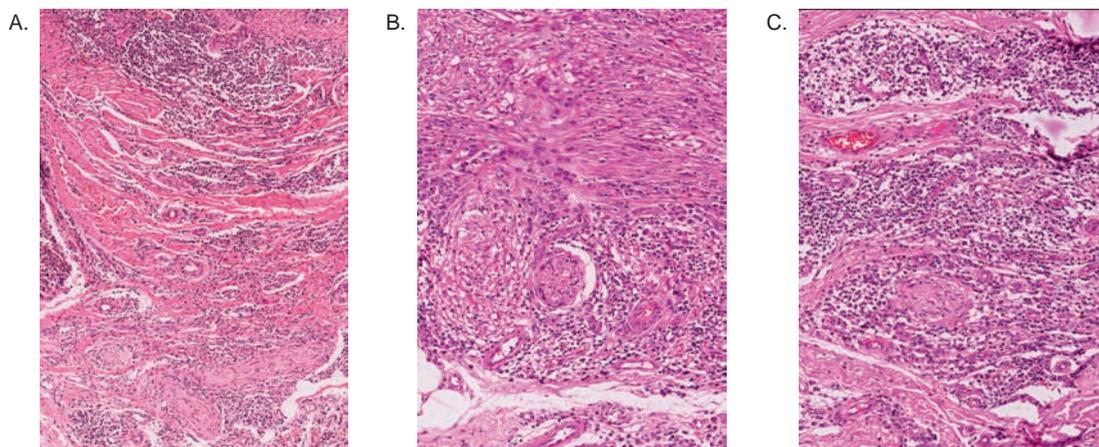
- A. El paciente tenía lepra multibacilar, aunque no se demostraron bacilos intraneurales, o
- B. La ausencia de bacilos en los nervios descartaba la lepra en estas biopsias.



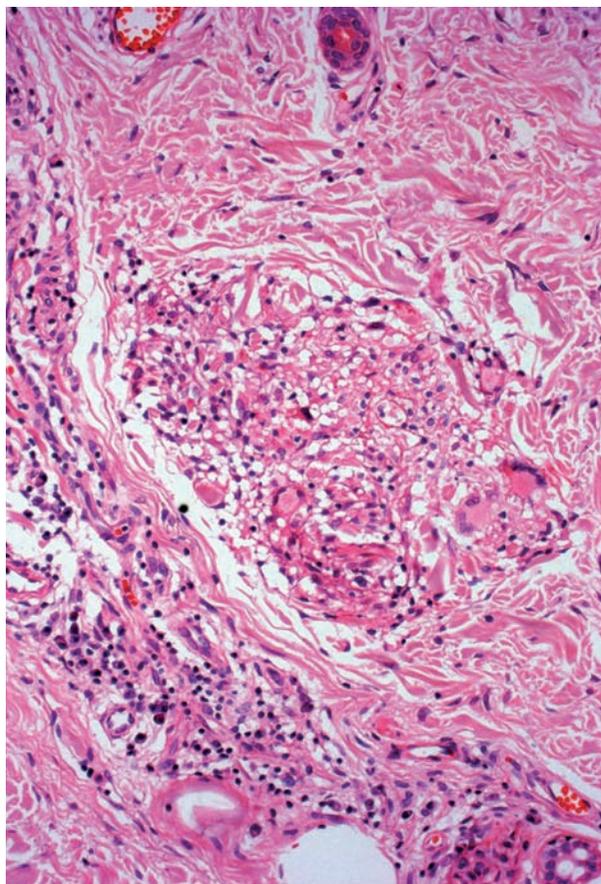
**Figura 2.** **A.** Imagen panorámica que muestra una lesión intradérmica, bien circunscrita, con absceso central superficial y exulceración. Hematoxilina y eosina, 2X. **B.** La lesión es hiper celular, con células fusiformes. Arriba, a la izquierda, se ve el componente abscedado. Hematoxilina y eosina, 10X. **C.** El componente fusiforme se acompaña de algunas células vacuoladas y de plasmocitos escasos, dispersos. Hematoxilina y eosina, 20X.



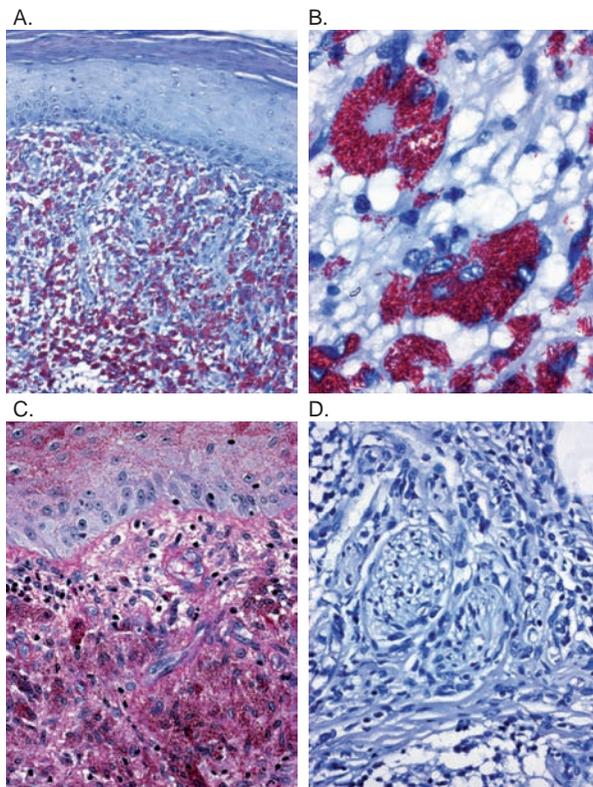
**Figura 3.** **A.** La lesión presenta también algunas células multinucleadas y conglomerados discretos de linfocitos (abajo, derecha). Hematoxilina y eosina, 20X. **B.** Este componente fusocelular subepidérmico contiene pocas células gigantes de tipo Touton (abajo, derecha). Hematoxilina y eosina, 20X. **C.** Pequeño grupo de células gigantes de tipo Touton. Hematoxilina y eosina, 40X.



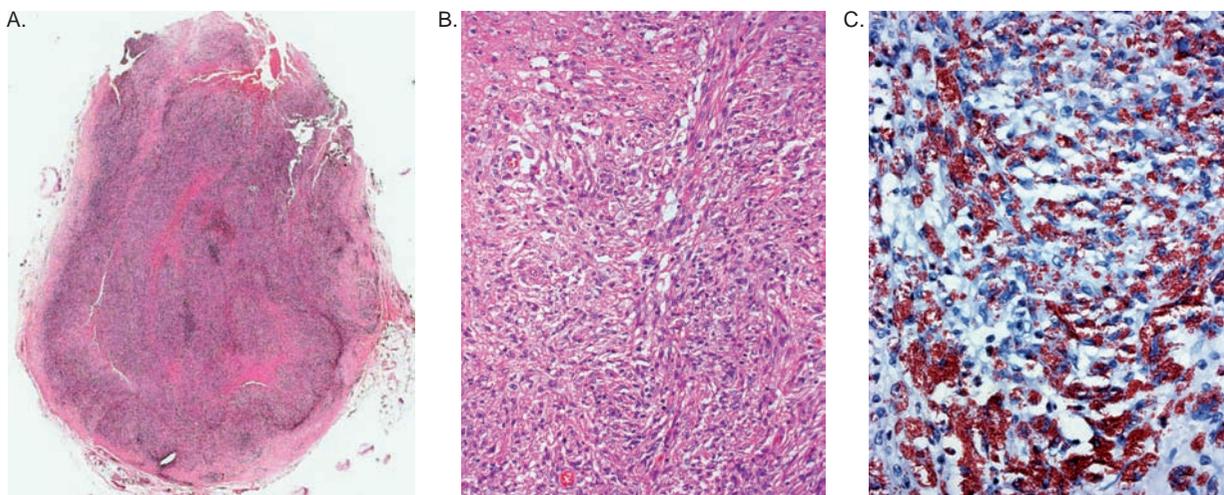
**Figura 4.** **A.** Fibrosis e inflamación perineural linfoplasmocitaria en el límite profundo de la lesión. Hematoxilina y eosina, 12X. **B.** Células fusiformes profundas y filete nervioso con perinervio mal definido, rodeado de importante infiltrado de plasmocitos y macrófagos vacuolados. Hematoxilina y eosina, 20X. **C.** Inflamación profunda, plasmocitaria, que rodea un filete nervioso. Hematoxilina y eosina, 20X.



**Figura 5.** Granuloma de macrófagos vacuolados, células epitelioides, algunas gigantes, linfocitos y plasmocitos, en los bordes laterales de la lesión. Hematoxilina y eosina, 20X.



**Figura 6.** **A y B.** La coloración de Ziehl-Neelsen muestra abundantes bacilos intracelulares, en grandes conglomerados, más aparentes en la superficie de la lesión. 20X y 100X. **C.** Los bacilos son también fuertemente positivos con la coloración del ácido peryódico de Schiff. 40X. **D.** La coloración de Ziehl-Neelsen no demuestra bacilos intraneurales ni en los infiltrados profundos. 40X.



**Figura 7.** **A.** El ganglio linfático está ampliamente reemplazado por infiltrado semejante al de la piel. Hematoxilina y eosina, 1X. **B.** El componente de células vacuoladas y fusiformes es prominente. Hematoxilina y eosina, 20X. **C.** La coloración de Ziehl-Neelsen demuestra un enorme número de bacilos fagocitados. 20X.

## PRESENTACIÓN DE CASO

# Síndrome de hipersensibilidad a medicamentos con exantema, eosinofilia y síntomas sistémicos inducido por carbamazepina

Jorge Alonso Marín<sup>1,2</sup>, Mayra Alexandra Ortega<sup>2</sup>, Isaura Pilar Sánchez<sup>2</sup>, José Armando Pacheco<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Hospital Marco Fidel Suárez, Bello, Colombia; Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia, Medellín, Colombia; Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia; Asociación de Toxicología Clínica Colombiana, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Investigaciones Biomédicas UniRemington, Facultad de Ciencias de la Salud, Corporación Universitaria Remington, Medellín, Colombia

El síndrome de hipersensibilidad a medicamentos, con exantema, eosinofilia y síntomas sistémicos (*Drug Rash Eosinophilia with Systemic Symptoms*, DRESS) es una reacción a diferentes medicamentos, principalmente anticonvulsivos, el cual cursa con compromiso sistémico y lesiones eritematosas, al igual que ocurre en diversas dermatosis por reacción a medicamentos. Este síndrome es una condición clínica poco frecuente, cuyo diagnóstico requiere un alto grado de sospecha por parte del personal clínico. Si no se hace un diagnóstico oportuno y se suministra el tratamiento adecuado, puede confundirse con otros tipos de alergias a medicamentos que implican riesgo de muerte.

Se presenta el caso de un paciente de 22 años de edad con alteración del neurodesarrollo a quien se le inició tratamiento con carbamazepina. Dos meses después consultó debido a la aparición de síntomas generales y lesiones eritematosas en la piel, inicialmente en el tronco. En la atención ambulatoria se le prescribieron antihistamínicos y antipiréticos, con los cuales no mejoró adecuadamente; su condición empeoró, con la aparición de lesiones en la piel y síntomas sistémicos propios del síndrome DRESS. Al cabo del tratamiento farmacológico administrado durante su hospitalización según los lineamientos recomendados, las manifestaciones y complicaciones asociadas con el síndrome remitieron, la administración de esteroides pudo reducirse gradualmente y, finalmente, el paciente fue dado de alta.

**Palabras clave:** síndrome de hipersensibilidad a medicamentos; exantema; eosinofilia; signos y síntomas; carbamazepina; anticonvulsivos; hipersensibilidad.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3170>

### Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms syndrome induced by carbamazepine: Case report

Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome is a hypersensitivity reaction associated with a variety of drugs, mainly anticonvulsants, which is characterized by systemic symptoms and erythematous lesions, common to other toxicodermas. It is an uncommon clinical entity that requires a high suspicion by clinical staff given its varied initial presentation, and the fact that symptoms can overlap with those of other adverse cutaneous reactions to drugs. Without early diagnosis and appropriate treatment, mortality increases.

We report the case of a 22-year-old patient with impaired neurodevelopment who received treatment with carbamazepine. Two months later he presented with general symptoms and skin erythematous lesions that began on his trunk. The patient received outpatient care with antihistamines and antipyretics without an appropriate response. His case progressed with increased skin lesions and systemic symptoms that met the diagnostic criteria for DRESS syndrome. He was hospitalized and received medical treatment according to recommended guidelines. The patient's condition improved as his symptoms and associated complications resolved. He was discharged with gradual clearing of the steroid therapy.

**Key words:** Drug hypersensitivity syndrome; eosinophilia; signs and symptoms; carbamazepine; anticonvulsants; hypersensitivity.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3170>

#### Contribución de los autores:

Jorge Alonso Marín: concepción y diseño del manuscrito, recolección de datos

José Armando Pacheco y Mayra Alexandra Ortega: manejo clínico y redacción del manuscrito

Isaura Pilar Sánchez: discusión de hallazgos clínicos y redacción del manuscrito

Todos los autores participaron en el análisis e interpretación de los datos, y en la revisión crítica del manuscrito.

El síndrome de exantema, eosinofilia y síntomas sistémicos (*Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms*, DRESS) fue descrito por primera vez en 1966 por Bocquet, *et al.*, quienes establecieron la definición de la enfermedad y los criterios de diagnóstico, precisando el cumplimiento de tres de ellos como mínimo. Tales criterios incluyen erupción cutánea, alteraciones hematológicas como eosinofilia ( $>1.500$  eosinófilos/ $\text{mm}^3$ ) o linfocitos atípicos, compromiso sistémico (adenopatías menores de 2 cm de diámetro, o hepatitis establecida por transaminasas dos veces por encima del valor normal, o nefritis intersticial o carditis) y fiebre (1-3).

El síndrome corresponde a una reacción adversa grave a medicamentos, potencialmente fatal y de etiología desconocida. Con una mortalidad de hasta el 10 %, se caracteriza por exantema, erupción, fiebre, leucocitosis con eosinofilia o linfocitos atípicos, adenopatías y compromiso de órganos internos, como riñón o hígado y, en algunos casos, mucosa oral (2-5). Los síntomas aparecen entre las tres y las 12 semanas de haberse iniciado el tratamiento con la sustancia causante (3).

Entre los fármacos anticonvulsivos más frecuentemente relacionados con el síndrome, se encuentran la carbamazepina (27 %), el alopurinol (11 %), la lamotrigina (6 %), el fenobarbital (6 %) y la fenitoína (4 %) (5,6), medicamentos que son utilizados en el tratamiento antiepiléptico, la neuralgia del trigémino, el trastorno bipolar e, incluso, la hiperuricemia. El síndrome se produce en muy pocos de los pacientes tratados con estos medicamentos, y su prevalencia y gravedad varían (7). Las manifestaciones cutáneas son algunas de las reacciones secundarias más comunes a los medicamentos; en los Estados Unidos, por ejemplo, su incidencia es de 100 casos por cada 1.000 nuevos usuarios de anticonvulsivos, especialmente del grupo de las aminas aromáticas (carbamazepina, fenitoína y lamotrigina) (8).

La fisiopatología del síndrome DRESS incluye defectos en la eliminación de los metabolitos activos de los fármacos, así como el retardo en su acetilación, lo cual da lugar a la acumulación de metabolitos reactivos capaces de desencadenar reacciones inmunológicas y de reactivar virus de la

familia Herpesviridae, incluido el virus de Epstein-Barr y el tipo 6 del virus herpes humano. En algunos estudios se ha demostrado que existe algún tipo de predisposición genética asociada a ciertos alelos del antígeno leucocitario humano en pacientes que pueden desarrollar este síndrome, la cual podría explicar estas reacciones (9,10).

La incidencia estimada de este síndrome es de 1 a 1.000 por cada 10.000 exposiciones farmacológicas y su incidencia en la población general es de 0,4 casos por 1'000.000 de habitantes, con una mortalidad estimada de 10 a 30 % (5).

En cuanto a las características demográficas de la población con síndrome DRESS, según diversos reportes, la edad promedio de presentación es de  $40,7 \pm 20,9$  años de edad, con una distribución por sexo de 53 hombres y 47 mujeres, en quienes el inicio de las manifestaciones clínicas ocurre, en promedio,  $3,9 \pm 2,6$  semanas después de la administración del fármaco desencadenante de las reacciones (10).

En el presente reporte, se presenta el caso de un paciente joven con síndrome DRESS asociado a carbamazepina, así como la revisión de los principales hallazgos reportados en artículos científicos en torno a los aspectos más relevantes de la enfermedad.

Es importante resaltar que se obtuvo el consentimiento informado por parte del padre del paciente para el uso de los datos de la historia clínica, así como la autorización para el reporte del caso.

### Caso clínico

Se reporta el caso de un paciente de 22 años de edad con alteración en el neurodesarrollo asociado a hipoxia perinatal, sin antecedentes de tratamiento previo con fármacos, funcionalidad adecuada en el hogar, y dedicado a labores de agricultura.

Por indicación del Servicio de Psiquiatría, se le comenzó a administrar carbamazepina en dosis de 200 mg cada 12 horas. A los 62 días, el paciente presentó malestar general, somnolencia, astenia, adinamia, cambios en el comportamiento y lesiones eritematosas en la piel del pecho y la espalda que una semana después se habían extendido al tronco y las extremidades, por lo cual consultó en el servicio de urgencias de su localidad. Allí recibió tratamiento con antihistamínicos y analgésicos, y se le dio de alta. Dos días después, las manifestaciones se agudizaron y tuvo que consultar de nuevo al hospital local.

#### Correspondencia:

Jorge Alonso Marín, Calle 51 N° 51-27, Medellín, Colombia  
Teléfono: (574) 322 1000, extensión 5610, y (312) 258 7895  
jorgeamarinc@gmail.com

Recibido: 30/11/15; aceptado: 30/08/16

En el momento del ingreso, el paciente presentaba una temperatura de 39,5 °C y lesiones maculopapulares morbiliformes en la piel y las mucosas, sin evidencia de epidermólisis ni signo de Nikolsky. Se inició tratamiento con esteroides intravenosos, antihistamínicos y antipiréticos. Los síntomas sugerían que el paciente estaba presentando manifestaciones concordantes con el síndrome DRESS.

Se le practicaron varios exámenes de laboratorio, los cuales evidenciaron un aumento de la creatinina que sugería falla renal aguda (cuadro 1). El análisis de orina fue positivo para proteinuria, eritrocitos, bacterias y uratos amorfos, por lo cual se le administró hidratación parenteral y se lo remitió dos días después al centro de mayor complejidad para su valoración por toxicología clínica y medicina interna.

En la evaluación del Servicio de Toxicología Clínica, se observó un paciente orientado, deshidratado, en regulares condiciones generales, con presión arterial de 130/90 mm Hg, frecuencia cardiaca de 90 por minuto, frecuencia respiratoria de 21 por minuto y temperatura de 39,8 °C. Además, presentaba edema facial con predominio palpebral, queilitis y mucosa oral seca; en el examen de piel, se encontraron lesiones eritematosas generalizadas y descamación (figura 1).

Se inició su tratamiento con 100 mg de hidrocortisona intravenosa cada ocho horas, la cual se suspendió a las 48 horas, reemplazándola con la administración por vía intravenosa de 8 mg de fosfato de dexametasona cada 12 horas, 50 mg de difenhidramina cada ocho horas, 50 mg de ranitidina cada ocho horas, dosis única de 1 g de

**Cuadro 1.** Exámenes de laboratorio practicados durante la hospitalización en la localidad de origen del paciente y en el Hospital San Juan de Dios de Rionegro

Exámenes de laboratorio	Hospitalización en la localidad de origen	Hospitalización en el Hospital San Juan de Dios de Rionegro									Unidades	Valor de referencia
		Día 1	Día 2	Día 4	Día 5	Día 6	Día 8	Día 9	Día 14	Día 16		
	<b>Medicado con carbamazepina</b>	<b>Ingreso</b>	<b>Diagnóstico confirmado</b>	<b>Fase aguda</b>				<b>Fase de resolución</b>				
Hemoglobina	14,3	14,2	16,5	14,9	14,3	15,6	-	11,2	10,3	9,7	g/dl	14 - 18
Hematocrito	46,8	38,6	44,6	40,8	29,3	41,6	-	30,6	28	26,7	%	42 - 48
Leucocitos	9,77	18,62	21,42	29,19	41,54	40,14	-	27,54	16,33	13,77	10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	4,5 - 10
Neutrófilos	79	46,2	60,20	52,60	46,50	51,70	-	72,40	10,51	7,25	%	40 - 74
Eosinófilos	6	30,10	13,10	2,40	3,80	1,30	-	-	0,42	0,88	%	0 - 7
Plaquetas	220	231	258	407	477	400	217	130	157	160	10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	150 - 400
Creatinina	2,4	2,7	3,5	3,3	2,4	1,9	1,3	1,2	0,9	-	mg/dl	0,7 - 1,3
Sodio	-	-	142	140	139	141	141	142	-	-	mEq/L	135 - 145
Potasio	-	-	4,6	4,3	4,1	4,1	3,0	3,2	-	-	mEq/L	3,5 - 5,5
Cloro	-	-	108	108	-	-	113	110	-	-	mEq/L	95 - 107
Magnesio	-	-	1,9	2,3	2,1	2,0	-	-	-	-	mg/dl	1,2 - 2,2
Calcio	-	-	7,3	7,6	-	7,5	-	7,3	-	-	mg/dl	8,6 - 10
CPK	-	311	-	-	-	52	234	-	-	-	u/l	0 - 175
Urea	-	-	89,9	107	98,4	100,6	20,8	53,5	44,9	-	mg/dl	-
Nitrógeno	-	-	42	50	46	47	-	25	21	-	mg/dl	7 - 25
PCR	-	67	105,6	31,2	17,9	9,7	-	-	11,3	11,5	mg/L	0 - 3
ALT	-	-	67	-	65	-	-	54	-	-	u/L	30 - 65
AST	-	-	32	-	33	-	-	29	-	-	u/L	15 - 37
FA	-	-	91	-	-	-	-	-	-	-	u/L	100 - 290
Albúmina	-	-	-	-	2,1	-	-	-	-	-	g/dl	3,8 - 5,4
TP	-	-	-	12,6	-	-	10,8	-	-	-	s	10,5
TPT	-	-	-	51,1	-	-	32	-	-	-	s	32,5
INR	-	-	-	1,39	-	-	1,02	-	-	-	s	-
Bilirrubina T	1,2	-	0,3	-	-	-	-	0,7	-	-	mg/dl	0 - 1
Bilirrubina D	0,8	-	0,1	-	-	-	-	0,3	-	-	mg/dl	0 - 0,3
Bilirrubina I	-	-	0,2	-	-	-	-	0,4	-	-	mg/dl	0 - 1
Glucemia	-	-	-	-	-	-	-	86	-	-	mg/dl	74 - 106
PCO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	31,1	31,2	39,2	-	-	mm Hg	35 - 45
PO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	79	68,5	40,1	-	-	mm Hg	80 - 100
Bicarbonato	-	-	-	-	-	16,8	19,4	23,3	-	-	mmol/L	22 - 26

PCO<sub>2</sub>: presión parcial de dióxido de carbono; PO<sub>2</sub>: presión parcial de oxígeno; INR: relación normalizada internacional; TPT: tiempo parcial de tromboplastina; TP: tiempo de protrombina; FA: fosfatasa alcalina; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; PCR: proteína C reactiva; CPK: creatinina fosfoquinasa; VR: valores de referencia



**Figura 1.** Lesiones eritematosas maculopapulares morbiliformes generalizadas y descamación asociada, con edema palpebral y sin evidencia de epidermolísis ni presencia del signo de Nikolsky

dipirona, así como la administración por vía oral de 1 g de acetaminofén cada seis horas, albendazol en dosis única de 400 mg, furosemida en dosis única de 20 mg por vía intravenosa, y betametasona en ungüento al 0,05 %, con lo cual se logró la mejoría.

En el reporte de laboratorio, se encontró leucocitosis con acentuada eosinofilia, y aumento de la creatinina y de la creatina-fosfocinasa; aunque las pruebas hepáticas y el ionograma fueron normales (cuadro 1), se sugirió vigilar los niveles de electrolitos en sangre, y la función renal y hepática.

Dado que el paciente había tenido oliguria durante la infancia y que la falla renal se había agudizado, se decidió practicar una ecografía renal y de vías urinarias para descartar una falla crónica. La valoración por nefrología y los hallazgos en la ecografía no evidenciaron cambios sugestivos de esta condición clínica, por lo cual se concluyó que el aumento en la creatinina se debía a una falla renal aguda. Además, los dos primeros análisis de orina, que habían mostrado proteinuria (30 mg/ml), se normalizaron durante su estancia hospitalaria.

En el sexto día de hospitalización, el paciente presentó tres convulsiones tónico-clónicas, disnea y aumento de la presión arterial, razón por la cual se inició la administración intravenosa de 500 mg de fenitoína intravenosa diluidos en 250 ml de solución salina más 10 mg de diazepam para el tratamiento de la convulsión aguda. Sin embargo, debido a los efectos secundarios de los anticonvulsivos de tipo de acetiladores lentos, como la fenitoína, y su incidencia en el síndrome DRESS, se decidió suspender el tratamiento y reemplazarlo por la administración intravenosa de 2 g de lorazepam cada seis horas y 5 mg de amlodipino cada 12 horas, y tres litros por minuto de oxígeno por cánula nasal; además, se solicitaron otros exámenes de laboratorio (cuadro 1).

A los seis días de la hospitalización, el paciente presentó fiebre y secreción de material purulento en el sitio del catéter venoso central que le fue colocado en el segundo día de hospitalización debido a la aparición de complicaciones vasculares, las cuales no podían haber respondido a la presencia de un absceso venoso periférico; por ello, se decidió iniciar el tratamiento con 1 g de vancomicina por vía intravenosa cada ocho horas. El paciente se sometió a cirugía para retirar el catéter, tomar una muestra para el cultivo destinado al estudio microbiológico e implantar un nuevo catéter. Presentó inestabilidad hemodinámica e hipertensión arterial sistémica persistente, la cual se trató con un bolo de 100 mg de labetalol; dado que también presentó encefalopatía de posible origen infeccioso, metabólico o hipertensivo, fue trasladado a la unidad de cuidados especiales.

Durante la estancia en dicha unidad, se evidenció inestabilidad hemodinámica que requirió el uso de vasopresores: 250 mg de dobutamina por vía intravenosa (4 µg/kg por minuto). Se observó, sin embargo, una tendencia hacia la hipertensión arterial, lo cual requirió la administración por vía intravenosa de 150 µg diarios de clorhidrato de clonidina, prazosina en tabletas de 1 mg cada 12 horas, amlodipino en tabletas de 5 mg cada 12 horas, y enalapril en tabletas de 20 mg cada 24 horas.

Se detectó una infección urinaria por *Klebsiella pneumoniae* negativa para betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y positiva para penicilinas. Los dos hemocultivos y la punta del catéter fueron positivos para *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, por lo cual se suspendió el tratamiento con vancomicina y se inició la

administración de cefepime, con una adecuada reacción del paciente, lo cual permitió su traslado a una sala general al cuarto día de estancia en la unidad de cuidados especiales.

A partir de ahí, el paciente tuvo una excelente reacción al tratamiento, con mejoría clínica y de laboratorio (cuadro 1, figura 2). Al cabo de la hospitalización de 17 días, se le dio de alta sin problemas.

### Discusión

El síndrome DRESS es una reacción adversa por hipersensibilidad, de tipo idiosincrático, la cual no está relacionada con la dosis del medicamento. Se han descrito algunos factores de riesgo, como ser de raza negra, tener un pariente en primer grado con reacción a anticonvulsivos y ser un acetilador lento (1). En este informe, se describe el caso de un paciente joven que, tras el uso de carbamazepina, presentó fiebre, erupción cutánea asociada a leucocitosis con eosinofilia y falla renal aguda, manifestaciones que concuerdan con las propias del síndrome DRESS (1).

Las manifestaciones clínicas del síndrome DRESS se presentan entre tres y 12 semanas después del inicio del tratamiento con el medicamento causante, en este caso, anticonvulsivos aromáticos; en individuos previamente sensibilizados, tales manifestaciones se desarrollan más tempranamente. El primer signo que aparece es la fiebre; los pacientes pueden cursar con síntomas inespecíficos que simulan el inicio de un cuadro gripal y presentar, además, erupción cutánea, malestar general y faringitis (3,4). En el curso de la enfermedad, la fiebre cede al cabo de dos días y la erupción tarda 10 días, en promedio (5).

En el presente caso, la fiebre se presentó a las ocho semanas. Después de estos síntomas generales, aparecieron las lesiones en la piel, las cuales pueden asociarse con adenopatías, en tanto que la afectación visceral se puede presentar de forma más tardía (4). Las manifestaciones cutáneas, que se presentan en 85 % de los casos, consisten en lesiones maculopapulares eritematosas de tipo morbiliforme que aparecen inicialmente en la cara y posteriormente se extienden en sentido cefalocaudal, comprometiendo el tronco y las extremidades, tal como se presentó en este paciente (4,11).

El compromiso sistémico puede presentarse, incluso, entre una y dos semanas después de la aparición de las lesiones en la piel. Pueden encontrarse adenopatías simétricas de más de 2 cm de diámetro, así como hepatoesplenomegalia,



**Figura 2.** Evolución clínica del paciente durante la hospitalización. **A.** Lesiones de tipo descamativo en cara durante los primeros seis días. **B.** Lesiones petequiales durante su estancia en la unidad de cuidados especiales. **C-D.** Disminución de las lesiones descamativas y del compromiso microvascular de la dermis, y resolución del cuadro clínico inicial.

siendo el hígado el órgano más comprometido (28 a 65 % de los casos), con manifestaciones que van desde una elevación leve de las enzimas hepáticas hasta una hepatitis tóxica aguda (3,12). El uso concomitante de otros fármacos hepatotóxicos (como el paracetamol para la fiebre) puede empeorar la situación. También se ha evidenciado el compromiso renal con nefritis intersticial y el compromiso pulmonar con neumonitis intersticial eosinofílica, disnea, tos seca y broncoespasmo, aunque, en general, cualquier órgano se puede ver afectado (10). En este paciente, el compromiso sistémico se evidenció como falla renal.

Las alteraciones hematológicas reportadas en el síndrome DRESS incluyen anemia, leucocitosis o leucopenia con eosinofilia, presencia de linfocitos atípicos y trombocitopenia (3). El paciente de este

caso presentó una clara leucocitosis con eosinofilia, además de trombocitopenia, criterios que sirvieron para aclarar el diagnóstico.

Las pruebas diagnósticas indicadas ante una sospecha de síndrome DRESS incluyen el leucograma, las pruebas de función hepática y renal, el análisis de orina, y la radiografía de tórax; en todos los casos, se deben descartar, además, las posibles causas infecciosas (4,6,8-10).

Ante un cuadro clínico en el cual se sospeche el síndrome DRESS, lo primero que debe hacerse es suspender el uso del medicamento causante e iniciar el tratamiento indicado, aplicar las medidas de soporte, y mantener una adecuada hidratación y el equilibrio hidroelectrolítico; asimismo, debe iniciarse la evaluación paraclínica (13,14).

Los cuadros leves en los que no haya compromiso de varios órganos, se pueden tratar con esteroides tópicos y antihistamínicos; sin embargo, en caso de un mayor compromiso, el tratamiento requerirá esteroides sistémicos, como la dexametasona (15 a 20 mg al día) o la prednisolona (0,5 a 0,7 mg/kg/día), durante períodos de hasta ocho semanas, siempre teniendo en cuenta que estos deben suspenderse gradualmente a lo largo de tres a seis meses para evitar recaídas después de la estabilización clínica y de los resultados de laboratorio (1,15,16). Una vez suspendido completamente el tratamiento con esteroides, se ha reportado que 18,5 % de los pacientes presentan recaídas de las cuales se recuperan al reiniciarlo, en tanto que 77,8 % de ellos se recuperan sin complicaciones (12).

Cuando los pacientes presentan necrólisis epidérmica tóxica, se recomienda el uso de pulsos de metilprednisolona en dosis diarias de 1 g durante tres días (5). En los casos graves, también se ha recomendado la inmunoglobulina humana en dosis intravenosas de 2 g/kg/día durante cinco días (16).

Dado que en algunos casos se puede presentar prurito intenso, se recomienda el uso de antihistamínicos de primera generación, como la hidroxicina o la difenhidramina (1). Asimismo, se ha utilizado la administración de N-acetilcisteína durante cuatro a seis días, con el fin de reponer la capacidad antioxidante e inhibir las reacciones inmunitarias mediadas por citocinas, así como la administración de pentoxifilina en dosis de 400 a 800 mg cada ocho horas durante 7 a 14 días, con el fin de bloquear el factor de necrosis tumoral alfa y disminuir así el riesgo de que se presenten el síndrome de Stevens-Johnson o una necrólisis epidérmica tóxica (3).

Es importante mencionar que el paciente cuyo caso se reporta presentó complicaciones infecciosas y metabólicas asociadas tanto a la atención de salud como al aumento de su sensibilidad, debido al compromiso multisistémico y el tratamiento farmacológico.

Los diagnósticos diferenciales del síndrome DRESS incluyen otras erupciones causadas por medicamentos, como el síndrome de Stevens-Johnson o la necrólisis epidérmica tóxica, las cuales se caracterizan por la aparición de leucopenia y linfopenia, en contraste con la marcada eosinofilia y la presencia de linfocitos atípicos predominantes en el síndrome DRESS (6). Considerando que en su primer episodio este síndrome puede confundirse con una amplia gama de enfermedades eritematosas, como el lupus eritematoso inducido por medicamentos, la enfermedad de Kawasaki y el sarampión con compromiso hepático (17), resulta imprescindible hacer un diagnóstico preciso de la enfermedad para administrar el tratamiento adecuado.

Un aspecto importante de la fisiopatología del síndrome DRESS es la reacción inmunológica. En algunos reportes se ha informado que el exantema se asoció a la función de los linfocitos T CD4+, aunque diferenciándolo de las lesiones con infiltración hemática mediada por los linfocitos T citotóxicos CD8+, los cuales constituyen un marcador de la gravedad del cuadro clínico (13,14,18,19).

Entre los factores ambientales, biológicos y genéticos asociados al desarrollo del síndrome DRESS, se ha reportado en varios estudios recientes la gran influencia de los factores genéticos en algunas poblaciones asiáticas. Mediante el uso de técnicas de purificación del ADN, de reacción en cadena de la polimerasa y de sondas de oligonucleótidos de cadenas específicas, se pudo detectar el alelo HLA-B\*1502 en pacientes tratados con carbamazepina, lo cual demostró que se trataba de un marcador genético de la predisposición a las reacciones alérgicas cutáneas en el 100 % de los pacientes evaluados (20,21). En otros estudios se han encontrado marcadores de la reacción inmunológica, entre los cuales está la quimiocina TARC/CCL17, la cual tiene un papel importante en el desarrollo de la reacción inflamatoria mediada por un perfil inmunológico de tipo Th2 (22,23).

Es de resaltar que en el caso de este paciente con síndrome DRESS por carbamazepina hubiese sido de gran valor contar con estudios genéticos e inmunológicos para confirmar su sensibilidad a

este medicamento, así como para una mejor caracterización paraclínica y para determinar posibles nuevas causas de la enfermedad (3,20), lo cual contribuiría a un mayor conocimiento sobre el factor dominante en este síndrome y a la implementación de nuevas técnicas diagnósticas y de tratamiento en aras de disminuir al máximo la tasa de morbimortalidad.

### Conclusión

El síndrome DRESS es una condición poco común de gran importancia en la práctica clínica debido a que en su fase inicial tiende a confundirse con otras dermatosis por reacción a medicamentos. El presente reporte contribuye a una mejor comprensión de la patogenia, el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad, lo cual es de gran importancia, ya que no todas las manifestaciones maculopapulares asociadas a tales dermatosis tienen el mismo origen, y es imprescindible conocer y correlacionar la clínica con los antecedentes farmacológicos para lograr un diagnóstico preciso y oportuno.

### Agradecimientos

Agradecemos al Hospital San Juan de Dios de Rionegro, Antioquia, por concedernos el aval para el acceso a los datos de la historia clínica del paciente bajo consentimiento informado.

### Conflicto de intereses

Ninguno de los autores declara tener conflicto de intereses de tipo financiero, político o académico en relación con el presente trabajo.

### Financiación

Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Medicina, Corporación Universitaria Remington.

### Referencias

1. Magliano J, Álvarez M, Salmentón M. Síndrome DRESS por carbamazepina. *Arch Pediatr Urug*. 2009;80:291-5.
2. Castagnino J, Musella R, Palmero D. Síndrome DRESS inducido por fármacos antituberculosis. *Revista Americana de Medicina Respiratoria*. 2011;3:141-6.
3. Sánchez X, Merlano C, Cruz C. Síndrome de hipersensibilidad a medicamentos con eosinofilia y síntomas sistémicos DRESS. *Rev Asoc Colomb Dermatol*. 2008;16: 208-10.
4. David P, Lackington I, Naranjo V, Oporto S, Leal C, Mena A. Actualización y presentación de serie clínica de síndrome de hipersensibilidad a fármacos anticonvulsivantes aromáticos o DRESS. *Revista Chilena de Epilepsia*. 2013;3:25-37.
5. Muciño J, Díaz M, Briones C, Guerrero A, Sandoval O, Sáenz A, *et al*. Síndrome de DRESS reporte de un caso clínico. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2013;51:330-5.
6. Grando L, Berger T, Marchiori R. Severe cutaneous reactions to drugs in the setting of a general hospital. *An Bras Dermatol*. 2014;89:758-62. <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142997>
7. Cormack M, Alfrevic A, Bourgeois S, Farrell J, Kasperaviciute D, Carrington M, *et al*. HLA-A 3101 and carbamazepine-induced hypersensitivity reactions in Europeans. *N Engl J Med*. 2011;364:1134-43. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1013297>
8. Stern RS. Exanthematous drug eruptions. *N Engl J Med*. 2012;366:2492-250. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMcp1104080>
9. Felgueiras P, Guerreiro E, Pereira E, López R. Síndrome de DRESS. *Galicia Clin*. 2011;72:185-7.
10. Valderrama F, Montoya L. Síndrome de hipersensibilidad a los anticonvulsivos. *Rev Colomb Psiquiat*. 2014;43:225-8.
11. Cacoub P, Musette P, Descamps V, Meyer O, Speirs C, Finzi L, *et al*. The DRESS syndrome: A literature review. *Am J Med*. 2011;124:588-97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.01.017>
12. Rojas C, Méndez L, Arab J, Barrera F, Soza A, Nervi F, *et al*. Síndrome de DRESS. Eritema cutáneo, fiebre y hepatitis asociado a lamotrigina. Reporte de dos casos y revisión de literatura. *Rev Gastroenterol Latinoam*. 2010;21:357-62.
13. Ríos J, Ríos M. El concepto P-I: una nueva teoría inmunológica sobre las reacciones cutáneas asociadas a fármacos. *Rev Méd Cient*. 2011;24:20-32.
14. Quintero D, Flores R, Torres L. Síndrome de DRESS asociado con carbamazepina. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2015;72:118-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmhimx.2015.03.007>
15. Ahluwalia J, Arkin L, Boos M, Dunn M, Treat J. Peripheral bands in the setting of drug hypersensitivity syndrome. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71:e153-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2014.06.007>
16. Hsiao YH, Hui RC, Wu T, Chang WC, Hsieh MS, Yang CH, *et al*. Genotype-phenotype association between HLA and carbamazepine-induced hypersensitivity reactions: Strength and clinical correlations. *J Dermatol Sci*. 2014;73:101-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.10.003>
17. Torres M, Olmos E. Reacciones medicamentosas severas - Síndrome Stevens Johnson y síndrome DRESS. *Acta Med Colomb*. 2013;38:76-82.
18. Hanafusa T, Azukizawa H, Matsumura S, Katayama I. The predominant drug-specific T-cell population may switch from cytotoxic T cells to regulatory T cells during the course of anticonvulsant-induced hypersensitivity. *J Dermatol Sci*. 2012;65:213-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.12.002>
19. Niu J, Jia Q, Ni Q, Yang Y, Chen G, Yang X, *et al*. Association of CD8+ T lymphocyte repertoire spreading with the severity of DRESS syndrome. *Sci Rep*. 2015;5:9913. <http://dx.doi.org/10.1038/srep09913>
20. Nguyen DV, Chu HC, Nguyen DV, Phan MH, Craig T, Baumgart K, *et al*. HLA-B\*1502 and carbamazepine-induced severe cutaneous adverse drug reactions in Vietnamese. *Asia Pac Allergy*. 2015;5:68-77. <http://dx.doi.org/10.5415/apallergy.2015.5.2.68>

21. **Cheng CY, Su SC, Chen CH, Chen WL, Deng ST, Chung WH.** HLA associations and clinical implications in t-cell mediated drug hypersensitivity reactions: An updated review. *J Immunol Res.* 2014;2014:565320. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/565320>
22. **Patiño A, Echeverry T, de la Cruz G, Guerra NT, Murcia LM, Aldana C.** Reacciones cutáneas severas a medicamentos. DRESS y sulfasalazina. *Acta Med Colomb.* 2012;37:83-8.
23. **Ogawa K, Morito H, Hasegawa A, Daikoku N, Miyagawa F, Okazaki A, et al.** Identification of thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) as a potential marker for early indication of disease and prediction of disease activity in drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS)/ drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS). *J Dermatol Sci.* 2013;69:38-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.10.002>

## PRESENTACIÓN DE CASO

# Casos de intoxicación aguda por plaguicidas en la colonia Puerto Pirapó, Itapúa, Paraguay, febrero de 2014

María Esther Pedrozo<sup>1</sup>, Sandra Ocampos<sup>1</sup>, Rosa Galeano<sup>1</sup>, Andrea Ojeda<sup>1,2</sup>,  
Agueda Cabello<sup>1,2</sup>, Dalva De Assis<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Entrenamiento en Epidemiología de Campo, Dirección General de Vigilancia de la Salud, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Asunción, Paraguay

<sup>2</sup> Centro Nacional de Enlace, Dirección General de Vigilancia de la Salud, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Asunción, Paraguay

En Paraguay, los plaguicidas, principalmente los compuestos organofosforados, son el agente causal del 13,7 % de las intoxicaciones reportadas. Las intoxicaciones con estos compuestos inhiben la enzima acetilcolinesterasa y pueden generar tres cuadros clínicos: la intoxicación aguda, el síndrome intermedio y una neurotoxicidad tardía.

Se presentan 15 casos de intoxicación aguda en diez mujeres y cinco hombres entre los 5 y los 67 años de edad, procedentes de una comunidad rural, cuyos síntomas se iniciaron después de haber utilizado el agua contaminada con plaguicidas de la red comunitaria. Los síntomas más frecuentes fueron náuseas y vómito, seguidos de dolor abdominal, cefalea, fiebre, prurito, hiperemia conjuntival y sudoración. En cinco de los pacientes se hizo el hemograma y se midieron los valores de las funciones renal y hepática, así como de la colinesterasa sérica, con resultados dentro de los valores de referencia; solo uno de los afectados presentó alteración de las enzimas hepáticas.

En dos muestras de agua de la red comunitaria, se detectó un compuesto organofosforado cuyo ingrediente activo era el profenofos. Es fundamental que el personal de atención primaria en salud, sobre todo en las zonas rurales, sea capaz de detectar los casos de intoxicaciones agudas por plaguicidas de manera oportuna, con el fin de brindar el tratamiento adecuado. Además, es necesario que las instituciones responsables supervisen el cumplimiento de las leyes ambientales en estas zonas, con el fin de evitar este tipo de incidentes.

**Palabras clave:** plaguicidas; insecticidas organofosforados; contaminación del agua; vómitos; informes de casos; Paraguay.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3264>

## Cases of acute pesticide poisoning in Colonia Puerto Pirapó, Itapúa, Paraguay, February, 2014

In Paraguay, pesticides are the causative agent in 13.7% of poisonings, especially organophosphorus compounds. Such poisoning produces the inhibition of acetylcholinesterase generating three possible clinical conditions: acute poisoning, intermediate syndrome or late neurotoxicity.

We present 15 cases of acute poisoning, ten women and five men from a rural community between 5 and 67 years of age, whose symptoms began after using water contaminated by pesticides from the community network. The most common symptoms were nausea and vomiting, followed by abdominal pain, headache, fever, itching, red eyes and sweating. Five patients underwent blood tests for blood count, renal and liver function and serum cholinesterase, with results within the reference values; just one patient had high liver enzymes.

In two samples from the community water supply network the active compound detected was profenophos. It is essential to train primary health care personnel to identify cases of acute pesticide poisoning in a timely manner to provide appropriate treatment, especially in rural areas. Additionally, it is necessary that responsible institutions monitor compliance with environmental regulations in these areas to avoid such incidents.

**Key words:** Pesticides; insecticides, organophosphate; water pollution; vomiting; case reports; Paraguay.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3264>

Desde hace unos años, Paraguay es el séptimo productor de soya en el mundo, con cerca de 2 % de la producción mundial (1,2). Este aumento en

la producción agrícola ha motivado la utilización masiva de plaguicidas agrícolas de forma tanto empírica como industrial (3), lo cual ha generado

### Contribución de los autores:

María Esther Pedrozo, Sandra Ocampos, Rosa Galeano: diseño del estudio, trabajo de campo y análisis de datos

Andrea Ojeda, Agueda Cabello, Dalva de Assis: revisión crítica del contenido

Todas las autoras participaron en la elaboración del manuscrito.

un problema para la salud pública debido a las intoxicaciones y las muertes ocasionadas, en su mayoría, por la incorrecta manipulación de dichas sustancias (4). Según el Centro Nacional de Toxicología, el agente causal en el 13,7 % de las intoxicaciones registradas son los plaguicidas (5), en primer lugar, los organofosforados (47,1 %), seguidos por los piretroides y las piretrinas (6-10).

Los plaguicidas organofosforados son sustancias extremadamente tóxicas que pueden inhibir de manera irreversible la enzima acetilcolinesterasa, si el caso no es tratado oportunamente (11-13). La excesiva estimulación de los receptores de la acetilcolina origina el síndrome colinérgico, con los consecuentes efectos muscarínicos, nicotínicos y en el sistema nervioso central (11).

Los efectos muscarínicos varían según el sitio afectado: en las glándulas exocrinas ocasiona aumento de la salivación, la lacrimación y la transpiración; en los ojos, visión borrosa, miosis (puntiforme y no reactiva) e hiperemia conjuntival; en el tubo digestivo, náuseas, vómitos, sensación de estrechez, inflamación y cólico abdominal, diarrea, tenesmo e incontinencia fecal; en las vías respiratorias, secreciones bronquiales excesivas, rinorrea, jadeo, sensación de estrechez del tórax, broncoespasmos, broncoconstricción, tos, bradipnea y disnea; en el sistema cardiovascular, bradicardia y disminución de la presión arterial, y en la vejiga, frecuencia e incontinencia urinaria.

Los efectos nicotínicos que afectan el sistema cardiovascular producen taquicardia, palidez y aumento de la presión arterial; en los músculos estriados generan fasciculación muscular en párpados y músculos faciales finos, calambres, mialgias, debilidad, parálisis flácida, temblor e hiperglucemia, y en el sistema nervioso central, somnolencia, letargia, fatiga, cefalea, ansiedad, confusión, irritabilidad, alteración del estado de conciencia, ataxia, cianosis, depresión respiratoria y convulsiones (11-13).

Las investigaciones de las situaciones de salud pública relacionadas con los plaguicidas son importantes porque fortalecen el sistema de información sobre las enfermedades que causan, así como sobre los perjuicios y los efectos medio-ambientales

adversos asociados con la exposición a plaguicidas (9). En Paraguay, las intoxicaciones por plaguicidas son de notificación obligatoria mediante ficha individual.

En este marco, el objetivo de este trabajo fue describir la investigación realizada por el equipo de epidemiología de campo en el incidente ocurrido en la colonia Puerto Pirapó, así como la presentación de los casos de intoxicación aguda por organofosforados.

### **Materiales y métodos**

Se hizo un estudio descriptivo de corte transversal entre el 26 de febrero y el 1° de marzo de 2014 en la colonia Puerto Pirapó del departamento de Itapúa, situada a 449 km de Asunción, capital del país. La colonia Puerto Pirapó es una comunidad rural compuesta por 70 familias dedicadas al cultivo de soya y por ocho productores a gran escala. Tienen dos formas de suministro de agua para el consumo: los pozos domiciliarios y un sistema de abastecimiento en red proveído por la junta local de saneamiento del Servicio Nacional de Saneamiento Ambiental.

Los datos se recolectaron de las fichas de notificación de intoxicaciones agudas por plaguicidas; además de las encuestas a los pobladores, se hicieron entrevistas no estructuradas al intendente municipal, al encargado del puesto de salud y al encargado de la junta local de saneamiento.

### **Trabajo de campo**

Se hizo una búsqueda activa comunitaria utilizando un cuestionario semiestructurado que incluía datos demográficos, como edad y sexo, y datos ambientales, como el tipo y la procedencia del agua para consumo, los plaguicidas utilizados, y la forma de exposición.

Se hicieron entrevistas en todas las viviendas en las que, en el momento de la encuesta, se encontrara al menos una persona adulta que aceptara contestarla.

Se utilizaron las siguientes definiciones:

a) caso sospechoso: "Toda persona residente o no de la zona que haya consumido o estado en contacto con el agua de la red comunitaria de Puerto Pirapó desde el 26 de febrero hasta el 1° de marzo del 2014, y que haya presentado uno o más de los siguientes síntomas: náuseas, vómitos, dolor abdominal, cefalea, miosis, sudoración, dificultad respiratoria o convulsiones".

#### **Correspondencia:**

María Esther Pedrozo, Dirección General de Vigilancia de la Salud, Pettirossi y Constitución, Asunción, Paraguay  
Teléfono: (595) 204 743  
estherbq@hotmail.com y esther.pedrozo.bq@gmail.com

Recibido: 17/03/16; aceptado: 01/09/16

b) Caso confirmado por laboratorio: "Caso sospechoso en el que las pruebas de laboratorio evidencian una alteración atribuible a la exposición a plaguicidas".

c) Caso confirmado por criterio clínico epidemiológico: "Caso sospechoso con al menos uno de los siguientes criterios: antecedente comprobado de exposición al plaguicida y que presente manifestaciones clínicas como consecuencia de esta exposición; que las características del cuadro clínico, la o las vías de exposición implicadas, la relación entre el agente causal y el mecanismo de acción y su asociación en el tiempo, se relacionan con las manifestaciones clínicas de la intoxicación".

Se hizo un reconocimiento ambiental de las zonas afectadas, georreferenciando las viviendas en las cuales se habían encontrado casos sospechosos, así como el tanque de abastecimiento de agua.

La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA), entidad responsable del control de la calidad del agua a nivel nacional, analizó las muestras de agua de la red comunitaria recolectadas por los afectados el día del evento utilizando el método de barrido MA-023 de pesticidas en agua mediante extracción en fase sólida por cromatografía de gases y espectrometría de masas (*Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, SPME-GCMS).

El análisis de datos se hizo con el programa informático Epi Info 7.1.6, usando medidas estadísticas de tendencia central y dispersión.

### **Consideraciones éticas**

La investigación de los casos se ajustó a los lineamientos para las investigaciones de brotes de la Dirección General de Vigilancia de la Salud. Los datos obtenidos se manejaron de forma confidencial y se usaron exclusivamente para el cumplimiento del objetivo propuesto.

### **Resultados**

Se visitaron 52 familias compuestas por 214 personas, de las cuales 111 (52 %) eran hombres; la mediana de edad fue de 25 años (rango de 3 meses a 86 años).

En cuanto al tipo de abastecimiento de agua para consumo, en 15 % (n=8) de las viviendas había pozo domiciliario y el 85 % (n=44) de ellas contaba con el sistema de la red comunitaria.

En las entrevistas, los integrantes de 15 de las familias de un mismo sector de la comunidad refirieron haber percibido un olor anormal en el agua de la

red de abastecimiento el 26 de febrero del 2014, y seis de estas familias utilizaron el agua en esas condiciones.

En cuanto a los plaguicidas utilizados en esa temporada, la mayoría eran fungicidas como el acetamiprid (compuesto orgánico clorado), además de herbicidas como el glifosato e insecticidas como la cipermetrina, entre otros que no pudieron ser precisados.

### **Presentación de los casos**

Se detectaron 15 casos: diez mujeres y cinco hombres entre los 5 y los 67 años de edad, que presentaron síntomas después de utilizar el agua de la red comunitaria con olor anormal en la preparación de infusiones (té) y en la cocción de alimentos, así como para la higiene personal, con lo cual se pudo establecer cuáles habían sido las vías de absorción.

Los síntomas más frecuentes fueron náuseas y vómitos, seguidos de dolor abdominal, deshidratación, cefalea, fiebre, prurito, hiperemia conjuntival, sudoración y dificultad respiratoria, entre otros (cuadro 1).

Siete de los 15 afectados acudieron a consulta médica pasadas 48 horas de la exposición, se les hicieron exámenes físicos y fueron hidratados parenteralmente. Debido a que los síntomas persistían, cinco de ellos acudieron a una segunda consulta (seis días después de la exposición) y, además de los exámenes físicos, se les tomaron muestras para análisis de sangre y hemograma, con el fin de establecer el perfil renal y el hepático, así como la colinesterasa sérica, con resultados dentro de los valores de referencia; solo uno de los pacientes presentó elevación de las enzimas hepáticas (cuadro 2). Todos los afectados evolucionaron favorablemente, sin complicaciones aparentes.

### **Investigación ambiental**

Se constató que, entre los grandes productores de soya, solo uno contaba con pozo domiciliario; los demás no contaban con dispositivos de suministro de agua en grandes cantidades para reabastecer los pulverizadores con capacidad de 2.000 litros utilizados en la preparación y la aspersión de los plaguicidas en los plantíos, por lo que utilizaban directamente los grifos de la red de abastecimiento de agua de la comunidad para la preparación de los plaguicidas. Según los pobladores, este mismo incidente ya habría ocurrido en dos oportunidades anteriores, pero sin consecuencias aparentes para su salud.

**Cuadro 1.** Características de los casos de intoxicación por agua contaminada con plaguicidas, colonia Puerto Pirapó, Itapúa, Paraguay, febrero de 2014

Caso	Sexo	Edad (años)	Vías de exposición al agua contaminada	Síntomas
1	Masculino	21	Oral	Náuseas, vómitos
2	Femenino	23	Oral	Náuseas, vómitos, deshidratación
3	Femenino	22	Oral	Náuseas, vómitos, deshidratación, dificultad respiratoria
4	Femenino	50	Oral-piel	Náuseas, vómitos, dolor abdominal, irritación ocular, sudoración, deshidratación, bradicardia
5	Masculino	67	Oral	Náuseas, vómitos, dificultad respiratoria
6	Femenino	5	Piel	Fiebre, prurito
7	Masculino	12	Piel	Fiebre, prurito
8	Femenino	23	Oral	Náuseas, vómitos, dolor abdominal, cefalea, sudoración
9	Femenino	36	Oral	Dolor abdominal, cefalea, sudoración
10	Masculino	12	Oral-piel	Náuseas, vómitos, prurito
11	Femenino	33	Oral-piel	Dolor abdominal, cefalea
12	Femenino	17	Oral-piel	Vómitos, dolor abdominal, cefalea
13	Masculino	59	Piel	Picazón, hiperemia conjuntival
14	Femenino	56	Oral-piel	Náuseas, cefalea
15	Femenino	59	Oral	Dolor abdominal, cefalea, decaimiento

**Cuadro 2.** Resultados de los análisis de bioquímica clínica en sangre de los casos de intoxicación con agua contaminada por plaguicidas, colonia Puerto Pirapó, Itapúa, Paraguay, febrero de 2014

Casos	Hematocrito (%)	Glóbulos blancos/mm <sup>3</sup> (5.000-10.000)*	ALP (GPT) (0-41 U/L)*	AST (GOT) (0-39 U/L)*	Colinesterasa sérica (3.300-9.000 U/L)*
1	46	5.900	100	42	6.722
2	41	7.800	13	23	3.500
3	42	4.400	19	39	4.590
4	46	8.300	17	31	3.200
5	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	6.108

\* Valores de referencia

ALP: alanina amino-transferasa; AST: aspartato amino-transferasa

En cuanto al análisis del agua, en dos de las tres muestras recolectadas de los grifos por los pobladores el día del evento, se detectó el compuesto profenofos, un tipo de plaguicida organofosforado, en concentraciones de 0,30 mg/dl y 39,26 mg/dl, respectivamente (figura 1).

### Medidas de control

Ante la percepción de que el agua de la red comunitaria presentaba condiciones anormales, los pobladores dieron aviso a sus vecinos, y se cortó el suministro del agua de consumo en toda la zona; 24 horas después, se hizo una reunión con el intendente municipal, los representantes de la junta de saneamiento y los pobladores, en la cual decidieron suspender oficialmente la utilización del agua de la red comunitaria por tres días. En este lapso se limpió el tanque (con solución de hipoclorito de sodio) y se dejaron los grifos abiertos.

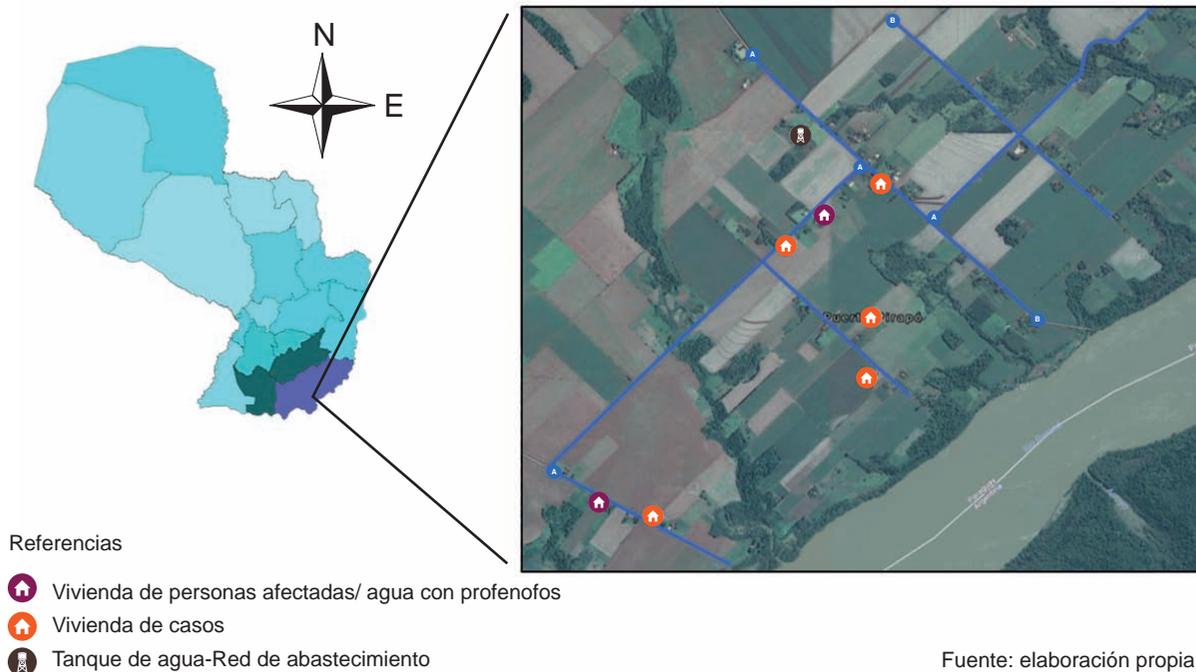
### Discusión

Todos los casos fueron confirmados con base en criterios clínicos y epidemiológicos: manifestaciones

clínicas de tipo muscarínico o nicotínico sugerentes de intoxicación por plaguicidas organofosforados y exposición al agua de la red comunitaria con características anormales coincidentes en tiempo y lugar, además de la detección de residuos de pesticidas organofosforados en las muestras de agua de la red comunitaria.

En todos los casos, la vía de absorción más importante fue el aparato digestivo por ingestión de alimentos preparados con el agua contaminada, lo cual coincide con otros reportes publicados (14). Según la clasificación de intoxicación aguda por plaguicidas propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS), los síntomas observados con mayor frecuencia (náuseas, vómitos, dolor abdominal, cefalea, sudoración e irritación ocular, entre otros) corresponden a intoxicaciones leves o transitorias de resolución espontánea (15).

Con respecto al equilibrio metabólico, el incremento de las enzimas hepáticas y las afecciones en riñones y sangre, no se pudieron constatar adecuadamente porque los análisis de laboratorio se



**Figura 1.** Ubicación del tanque de la red de abastecimiento de agua con respecto a las viviendas de las personas afectadas por la intoxicación con plaguicidas, colonia Puerto Pirapó, Itapúa, Paraguay, febrero de 2014

hicieron solo en un tercio de los casos y luego de seis días de ocurrido el incidente. Sin embargo, en aquellos casos en que sí se hicieron los análisis de sangre, los valores del hemograma resultaron normales, y únicamente uno de los afectados presentó alteración del perfil hepático, hallazgos que son similares a los descritos por Díaz, *et al.* (16).

Si bien la confirmación por el laboratorio de las intoxicaciones debidas a la exposición a organofosforados se evidencia en la disminución de la actividad de la colinesterasa, también se ha visto que en los casos leves debe contarse con los valores basales de los individuos para, así, detectar la posible inhibición de dicha actividad (17), lo cual se dificulta cuando se trata de accidentes. Asimismo, la colinesterasa sérica es más sensible pero menos específica para el diagnóstico, pues se regenera espontáneamente en días o semanas (18).

La intoxicación afectó principalmente a las mujeres adultas, lo cual probablemente se debió a que en las zonas rurales son ellas quienes normalmente permanecen más tiempo en las viviendas, ocupadas en las tareas del hogar y, por ende, más expuestas al agua de consumo. Al igual que en otros países, se constató que solo las personas con manifestaciones graves buscaron atención

médica, pues en los casos leves o moderados los afectados no siempre acuden a los servicios de salud y no son diagnosticados (19,20).

El hecho de que en las muestras de agua de los grifos se detectara el pesticida organofosforado profenofos hace suponer que este compuesto estuvo en circulación en dicha zona. Este es un plaguicida moderadamente peligroso (clase II), según la clasificación de la OMS (21,22). En cuanto al incidente ocurrido, se presume que durante el llenado del pulverizador se produjo el retorno del plaguicida hacia el suministro de agua por un efecto de sifón, y así se contaminó la red de cañerías del agua comunitaria.

Dada la poca disponibilidad de biomarcadores, en especial en zonas rurales, se ha visto la ventaja de utilizar los cuestionarios sobre los síntomas como criterio para la definición de casos (20).

En conclusión, es fundamental que el personal de atención primaria en salud, sobre todo en las zonas rurales, sea capaz de detectar los casos de intoxicaciones agudas por plaguicidas de manera oportuna, con el fin de brindar el tratamiento adecuado. Además, es necesario que las instituciones responsables supervisen el cumplimiento de las leyes ambientales en las zonas rurales, con el fin de evitar este tipo de incidentes.

## Agradecimientos

A Noël Barengo y Malvina Páez, por la revisión crítica del manuscrito.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Financiación

El trabajo se hizo en el marco de las investigaciones de brotes de la Dirección General de Vigilancia de la Salud, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social de Paraguay.

## Referencias

1. **Markley B.** Paraguay Oilseeds and Products Annual-2014. USDA Foreign Agricultural Service, 2014. Fecha de consulta: 20 de mayo de 2014. Disponible en: [http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Oilseeds%20and%20Products%20Annual\\_Buenos%20Aires\\_Paraguay\\_2-26-2014.pdf](http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Oilseeds%20and%20Products%20Annual_Buenos%20Aires_Paraguay_2-26-2014.pdf).
2. **Yankelevich A, Sallyards M.** Paraguay Agricultural Biotechnology Annual. Paraguay Annual Biotech Report. USDA Foreign Agricultural Service. Fecha de consulta: 20 de mayo de 2014. Disponible en: [http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Agricultural%20Biotechnology%20Annual\\_Buenos%20Aires\\_Paraguay\\_8-8-2012.pdf](http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Agricultural%20Biotechnology%20Annual_Buenos%20Aires_Paraguay_8-8-2012.pdf).
3. **Ortega G.** Agrotóxicos y ley sobre plaguicidas. Asunción, abril, 2007. Documento de trabajo N° 116. Fecha de consulta: 22 de mayo 2014. Disponible en: [http://www.portalguarani.com/detalles\\_museos\\_otras\\_obras.php?id=87&id\\_obras=2038&id\\_otras=295](http://www.portalguarani.com/detalles_museos_otras_obras.php?id=87&id_obras=2038&id_otras=295).
4. **Ministerio de Agricultura y Ganadería.** Uso y manejo seguro de plaguicidas en Paraguay. Asunción: MAG; 2004.
5. **Arias V, Aquino F, Delgadillo L, Ferreira J, González C, Ojeda A.** Intoxicación por plaguicidas en pacientes asistidos en el Centro Nacional de Toxicología del Ministerio de Salud Pública. Mem Inst Investig Cienc Salud. 2006;4:50-4.
6. **Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Centro Nacional de Toxicología.** Estadísticas año 2008. Fecha de consulta: 5 de junio de 2014. Disponible en: [http://www.mspbs.gov.py/toxicologia/wp-content/uploads/2013/04/ESTADISTICAS\\_2008.pdf](http://www.mspbs.gov.py/toxicologia/wp-content/uploads/2013/04/ESTADISTICAS_2008.pdf).
7. **Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Centro Nacional de Toxicología.** Estadística año 2009. Fecha de consulta: 20 de mayo de 2014. Disponible en: [http://www.mspbs.gov.py/toxicologia/wp-content/uploads/2013/04/ESTADISTICAS\\_2009.pdf](http://www.mspbs.gov.py/toxicologia/wp-content/uploads/2013/04/ESTADISTICAS_2009.pdf).
8. **Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Centro Nacional de Toxicología.** Estadística año 2010. Fecha de consulta: 20 de mayo de 2014. Disponible en: [http://www.mspbs.gov.py/toxicologia/wp-content/uploads/2013/04/ESTADISTICAS\\_2010.pdf](http://www.mspbs.gov.py/toxicologia/wp-content/uploads/2013/04/ESTADISTICAS_2010.pdf).
9. **Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Centro Nacional de Toxicología.** Estadística año 2011. Fecha de consulta: 20 de mayo de 2014. Disponible en: [http://www.mspbs.gov.py/toxicologia/wp-content/uploads/2013/04/ESTADISTICAS\\_2011.pdf](http://www.mspbs.gov.py/toxicologia/wp-content/uploads/2013/04/ESTADISTICAS_2011.pdf).
10. **Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Centro Nacional de Toxicología.** Estadística año 2012. Fecha de consulta: 20 de mayo de 2014. Disponible en: [http://www.mspbs.gov.py/toxicologia/wp-content/uploads/2013/04/ESTADISTICAS\\_2012.pdf](http://www.mspbs.gov.py/toxicologia/wp-content/uploads/2013/04/ESTADISTICAS_2012.pdf).
11. **Klassen C, Watkins J.** Manual de toxicología. La ciencia básica de los tóxicos. 5ª edición. México, D.F.: McGraw-Hill/Interamericana de México; 2001. p. 981.
12. **Lazcano R.** Toxicología clínica. Buenos Aires: Akadia Editorial; 2003. p. 625-13.
13. **Mathews CK, van Holde K, Ahern KG, van Holde KE.** Bioquímica. Tercera edición. Pearson Educación, S. A. Madrid, España; 2002. p. 876-80.
14. **Ramírez JA, Lacasaña M.** Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Arch Prev Riesgos Labor. 2011;4:67-75.
15. **Thundiyil J, Stober J, Besbelli N, Pronczuk J.** Acute pesticide poisoning: A proposed classification tool. Bull World Health Organ. 2008;86:205-9.
16. **Díaz V, Pistilli N, Guillén R, Melgarejo MV, Velázquez G.** Valores hematológicos en individuos expuestos accidentalmente a insecticidas organofosforados. Mem Inst Investig Cienc Salud. 2002;1:1-4.
17. **Ibarra EJ, Linares TM.** La inhibición de la actividad colinesterásica sanguínea como biomarcador de exposición a compuestos organofosforados y carbamatos. Revista Cubana de Salud y Trabajo. 2012;13:59-65.
18. **Milla OM, Palomino WR.** Niveles de colinesterasa sérica en agricultores de la localidad de Carapongo (Perú) y determinación de residuos de plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa en frutas y hortalizas cultivadas. Tesis. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2002. Fecha de consulta: 5 de julio de 2014. Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/salud/milla\\_c\\_o/indice.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/salud/milla_c_o/indice.htm).
19. **Badii MH, Varela S.** Insecticidas organofosforados: efectos sobre la salud y el ambiente. Culcyt. 2008;28:5-16.
20. **Faria N, Rodrigues J, Facchini L.** Intoxicações por agrotóxicos entre trabalhadores rurais de fruticultura, Bento Gonçalves, RS. Rev Saúde Pública. 2009;43:335-44. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102009005000014>
21. **World Health Organization - WHO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación - FAO.** Código internacional de conducta sobre la distribución y utilización de plaguicidas. Directrices para desarrollar un sistema de información sobre incidentes de salud y medioambientales causados por exposición a plaguicidas. Fecha de consulta 24 de junio 2014. Disponible en: [http://www.who.int/whopes/recommendations/Incident\\_reporting\\_2009\\_Spa.pdf?ua=1](http://www.who.int/whopes/recommendations/Incident_reporting_2009_Spa.pdf?ua=1).
22. **Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales - España, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.** NTP 513: Plaguicidas organofosforados (II): toxicodinamia y control biológico. 1999. Fecha de consulta: 28 de junio de 2014. Disponible en: [http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/501a600/ntp\\_513.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/501a600/ntp_513.pdf).
23. **Fernández AD, Mancipe GL.** Intoxicación por organofosforados. Revista Med. 2010;18:84-92.

ORIGINAL ARTICLE

## Performance of LED fluorescence microscopy for the detection of acid-fast bacilli from respiratory samples in peripheral laboratories in Argentina

María Imaz<sup>1</sup>, Sonia Allassia<sup>2</sup>, Mónica Aranibar<sup>3</sup>, Alba Gunia<sup>4</sup>, Susana Poggi<sup>5</sup>, Ana Togneri<sup>6</sup>, Lidia Wolff<sup>7</sup>, Group of Implementation of Fluorescence Microscopy

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Emilio Coni", ANLIS "C.G. Malbrán", Santa Fe, Argentina

<sup>2</sup> Dirección de Bioquímica de la Municipalidad de Rosario, Rosario, Argentina

<sup>3</sup> Hospital San Roque, San Salvador de Jujuy, Argentina

<sup>4</sup> Laboratorio Central de Salud Pública, Resistencia, Argentina

<sup>5</sup> Hospital "Dr. Francisco Javier Muñiz", Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

<sup>6</sup> Hospital Interzonal General de Agudos "Evita", Lanús, Argentina

<sup>7</sup> Hospital Rawson, Córdoba, Argentina

**Introduction:** Light-emitting diode fluorescence microscopy (LED-FM) has been endorsed by the World Health Organization (WHO) for tuberculosis diagnosis, but its accuracy in HIV-infected patients remains controversial, and only some few studies have explored procedural factors that may affect its performance.

**Objective:** To evaluate the performance of LED-FM for tuberculosis diagnosis in patients with and without HIV infection using a newer, less expensive LED lamp.

**Materials and methods:** We compared the performance of LED-FM and Ziehl-Neelsen (ZN) microscopy on respiratory specimen smears from tuberculosis (TB) suspects and patients on treatment examined by different technicians blinded for HIV-status and for the result of the comparative test. We analyzed the effect of concentrating specimens prior to microscopy using different examination schemes and user-appraisal of the LED device.

**Results:** Of the 6,968 diagnostic specimens collected, 869 (12.5%) had positive *Mycobacterium tuberculosis* cultures. LED-FM was 11.4% more sensitive than ZN ( $p < 0.01$ ). Among HIV-positive TB patients, sensitivity differences between LED-FM and ZN (20.6%) doubled the figure obtained in HIV-negative patients or in those with unknown HIV status (9.3%). After stratifying by direct and concentrated slides, the superiority of LED-FM remained. High specificity values were obtained both with LED-FM (99.9%) and ZN (99.9%). The second reading of a sample of slides showed a significantly higher positive detection yield using 200x magnification (49.4%) than 400x magnification (33.8%) ( $p < 0.05$ ). The LED-device had a very good acceptance among the technicians.

**Conclusion:** LED-FM better performance compared with ZN in HIV-infected patients and user-appraisal support the rapid roll-out of LED-FM. Screening at 200x magnification was essential to achieve LED-FM increased sensitivity.

**Key words:** Tuberculosis; fluorescence; microscopy; diagnosis; sputum; acid-fast bacilli.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3276>

### Rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED para la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes en muestras respiratorias en laboratorios periféricos de Argentina

**Introducción.** La microscopía de fluorescencia con lámpara LED (MF-LED) ha sido recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el diagnóstico de la tuberculosis, pero su precisión en pacientes con HIV continúa siendo controversial y en pocos estudios se han explorado los factores metodológicos que pueden afectar su utilidad.

**Objetivo.** Evaluar el rendimiento de la MF-LED en el diagnóstico de la tuberculosis en pacientes con HIV y sin él mediante un novedoso dispositivo LED.

**Materiales y métodos.** Se comparó el rendimiento de la MF-LED y la microscopía en frotis de muestras respiratorias con tinción de Ziehl-Neelsen (M-ZN) examinados por técnicos cegados en cuanto al estado

#### Author's contributions:

María Imaz: Conception and design of the study, analysis and interpretation of data and writing of the manuscript

Sonia Allassia, Mónica Aranibar, Alba Gunia, Susana Poggi, Ana Togneri and Lidia Wolff: Diagnostic tests, data collection, analysis and interpretation

Group of Implementation of Fluorescence Microscopy: Diagnostic tests, data collection

All authors participated in the review and approval of the final version of the manuscript.

de HIV y el resultado de la prueba comparativa. Se analizó el efecto de concentrar muestras antes de la microscopía, usar diferentes esquemas de observación y la valoración con el dispositivo LED.

**Resultados.** De las 6.968 muestras recolectadas, 869 (12,5 %) resultaron con cultivo positivo para *Mycobacterium tuberculosis*. La MF-LED fue 11,4 % más sensible que la M-ZN ( $p < 0,01$ ). Entre los pacientes con tuberculosis positivos para HIV, la diferencia de sensibilidad entre la MF-LED y la M-ZN (20,6 %) duplicó la cifra obtenida en pacientes negativos para HIV o con estatus desconocido (9,3 %). Al estratificar los frotis en directos y concentrados, se mantuvo la superioridad de la MF-LED. Las especificidades de la MF-LED (99,9 %) y la M-ZN (99,9 %) resultaron elevadas. La lectura de una muestra de frotis mostró una positividad significativamente mayor con un aumento de 200X (49,4 %) que con uno de 400X (33,8 %) ( $p < 0,05$ ). El dispositivo LED tuvo una buena aceptación entre los técnicos.

**Conclusión.** Debido al mejor desempeño de la MF-LED comparada con la M-ZN en pacientes con HIV y su fácil utilización, se recomienda su adopción. La utilización del aumento de 200X fue esencial para el incremento de la sensibilidad de la MF-LED.

**Palabras clave:** tuberculosis; fluorescencia; microscopía; diagnóstico; esputo; bacilo ácido-alcohol resistente.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3276>

As of 2011, the World Health Organization has recommended the use of LED fluorescence microscopy (FM) as an alternative of Ziehl-Neelsen (ZN) in a phased manner for a more rapid tuberculosis (TB) diagnosis (1). FM offers many advantages over ZN. It can detect approximately 5-10% more acid-fast bacilli (AFB) positive smears (2) than ZN. The higher contrast of AFB fluorescence allows the screening of slides at a much lower magnification (200X or 400x) than ZN (1,000X), and they can be examined more quickly, which offers potential solutions to the high workload in some laboratories (3). Besides, FM staining quality may be easier to control because the quality of commercial auramine dye is less variable than that of basic fuchsin (4). Furthermore, the staining technique is simpler and the auramine solution is easier to prepare (5). As no immersion objective is needed to observe the bacilli, there is no need to use the immersion oil and the xylene required with ZN, which are both expensive and may damage the objectives through mishandling or due to poor quality (6). However, fluorescent microscopes using mercury-vapor lamps (MVL) are relatively expensive, they have a short life span and require a reliable electricity supply, besides, replacement bulbs may be difficult to obtain (1). These factors have led to an interest in FM using LED. Compared to conventional MVL fluorescence microscopes, LED microscopes are less expensive

and have fewer maintenance requirements. The diodes are very durable, do not require warm-up time, and do not contain toxic products. More importantly, they are reported to perform equally well without a darkroom (1).

As HIV-infected patients are considered a population in whom ZN microscopy tends to produce a low yield, interventions to increase the sensitivity of microscopy are needed. Conventional MVL-FM has shown promising results in HIV-infected individuals; two relevant studies have reported that FM was significantly more sensitive for the diagnosis of pulmonary TB than ZN microscopy in this group of patients (7,8). On the other hand, accuracy data for LED-FM in HIV-infected patients are scarce (9-12); furthermore, the results of some studies are conflicting with those obtained with conventional FM, showing a similar sensitivity (10) or lower specificity (9, 11) values for LED-FM compared with ZN smear microscopy. In addition, only few studies have evaluated the possible effect of sputum processing on the performance of LED-FM, as well as the best scheme for smear examination to achieve increased sensitivity (10,12,13). Besides, as available commercial LED systems may have different operational characteristics, to scale up the replacement of ZN by LED-FM more research is needed to evaluate the different LED systems recently introduced in the market. In low and middle income countries, local production and technology transfer is a good strategy to increase access to medical devices. The TK-LED microscope lamp (Tolket S.R.L.), produced by a technology company based in Buenos Aires, Argentina, uses the latest high power LED illumination technology, it is compatible with most leading microscope brands and can be adapted to any of them on requirement.

Corresponding author:

María Imaz, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Emilio Coni", Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "C.G. Malbrán", Avenida Blas Parera 8260, 3000, Santa Fe, Argentina

Teléfono y fax: (54) (342) 489 2830, extensión 3  
suimaz@yahoo.com

Received: 28/03/16; accepted: 17/07/16

Argentina has a well-structured TB laboratory network which performs approximately 150,000 AFB smear microscopy examinations every year. The technical quality and agreement of ZN smear microscopy has been satisfactory over the last years, but operational and epidemiological analyses have shown that there is a need of increasing the number of sputa studied by microscopy in order to prevent diagnostic delay (14,15). The replacement of light microscopy by FM would be one of the immediate options to cope with expected increases in workload, especially in high-burden settings.

This study evaluated the performance of LED-FM for the detection of AFB from respiratory samples of patients with and without HIV infection using a newer, less expensive national LED lamp mounted on an Olympus CX31 microscope, taking culture as the reference standard. We also evaluated different LED-FM technical requirements under field conditions.

## Materials and methods

### *Participating laboratories and technicians*

In 2012, seven public laboratories were included in a multicenter project to assess the feasibility of using LED-FM in Argentina. Two of these laboratories had previous experience in conventional FM, and one of them was designated as coordinating center responsible for training, monitoring, slide rechecking and data management. The project was developed in two phases: (i) The technicians training phase, and (ii) the LED-FM evaluation study itself. The first phase was held during 2012, whereas the assessment study was accomplished during 2013 and 2014.

Laboratories were selected according to their workload, HIV prevalence among TB patients and interest in the project. Besides, to be eligible the site had to have acceptable performance in ZN blinded smear rechecking process during the last three years. A ZN acceptable performance laboratory was defined as that with less than 5% error rate and no high false positive or high false negative errors.

The technicians involved in the project attended a three-day course followed by a two-month on-site training in which each technician examined slides from the same specimen stained by ZN and FM in unblinded manner in order to acquire confidence to recognize the bacillus. During this training phase, technicians proficiency was evaluated using a monthly testing panel (composed of nine negative and nine positive smears with different positivity

degrees), and a monthly random blinded rechecking. Trainees were evaluated only if they showed an acceptable performance defined as follows: 1) At the most, one low false negative (LFN) error, i.e., a scanty (1-19 AFB/1 length) positive smear misread as negative, without any high false negative results (a 1+ to 3+ positive smear misread as negative) or false positive errors (FP), i.e., a negative smear misread as positive in the last proficiency testing panel, and 2) at the most two minor errors (no more than one LFP, i.e., a negative smear misread as a scanty one, 1-19 AFB /1 length) without any major error (high false positive or high false negative) in the rechecking process.

### *Clinical specimens included in the evaluation study and smear microscopy*

This study was conducted using specimens submitted routinely to the participating laboratories for mycobacterial culture. We included a total of 6,968 diagnostic and 2,419 follow-up respiratory specimens (comprising sputum, bronchialveolar lavage, bronchial wash and lung aspirates).

Direct or concentrated smears (16) were prepared in duplicate following the method routinely used in each participating laboratory. Hot ZN technique (0.3% carbolfuchsin and 0.1% methylene blue) (17) or 0.1% auramine O (counterstained with 0.5% potassium permanganate) for LED-FM (18) were used for staining each of these slides. ZN slides were examined with the bright field microscopy used routinely in each laboratory at 1,000X magnification, whereas FM slides were examined with Olympus CX31 microscopes with a TK-LED illumination (Tolket S.R.L., Buenos Aires, Argentina), using 200X magnification for screening and 400X magnification for confirming and quantifying the slides. The laboratory technicians were also advised to read doubtful slides using higher magnification (1,000X) for confirmation. LED-FM grading of smears was done according to WHO/IUTLD guidelines (18), whereas ZN grading was made according to national guidelines (17) (table 1). After examination, all smears were kept in a dark room at ambient temperature (23°-27°C). After smear preparation, all specimens were decontaminated, concentrated by centrifugation and the deposits were inoculated on solid and/or liquid media according to the technique routinely established in each participating laboratory and following the national tuberculosis guidelines on culture (16). The result of diagnostic samples culture was used as the reference standard. Once contaminated

**Table 1.** Grading scale for acid fast bacilli (AFB) found by ZN and FM

National scale ZN (1,000X magnification, 1 length of 2 cm=100 fields)		Union/WHO scale FM (400X magnification, 1 length of 2 cm=40 fields)	
Negative	Zero AFB/100 fields	Negative	Zero AFB/1 length
1+ <sup>a</sup>	<99 AFB/100 fields <sup>a</sup>	Scanty <sup>b</sup>	1-19 AFB/1 length
		1+	20-199 AFB/1 length
2++	1-10 AFB/1 field	2++	5-50 AFB/1 field
3+++	>10 AFB /1 field	3+++	>50 AFB/1 field

<sup>a</sup> <5 AFB/1 length: confirmation required<sup>b</sup> <3 AFB/1 length: confirmation required

specimens or those in which a non-tuberculous mycobacterium was isolated were excluded, 6,637 diagnostic and 2,419 follow-up specimens were finally analyzed. HIV status data was extracted from the registers kept in the participating laboratories.

A similar proportion of slides stained by ZN and FM were read by the microscopists unaware of patients' characteristics and comparative tests results. In one of the laboratories, in which only one technician was responsible for reading both slides, blinding was ensured by labelling FM and ZN slides with different identification numbers; besides, different registers were used to record ZN and FM results.

The external quality assurance protocol as specified by national guidelines for ZN microscopy (17) was in place in all these services. For the purpose of this multicenter evaluation, FM performance was assessed by rechecking all slides at the coordinating center. Slides were re-stained to avoid discrepancies in reading. Onsite evaluation was also carried out by technical consultants from the coordinating center during supervisory visits, and no discordances were found between laboratory technicians and supervisors results.

During all the training phases, patient care was based on the results of ZN examination and, therefore, laboratory comparisons did not affect routine patient management or involved collection of additional samples, so individual informed consent was not necessary.

### Comparison of examination schemes

This evaluation was conducted at the coordinating center: A sample of 160 slides previously read using TK-LED was selected by picking all scanty positive slides detected during the study period at the coordinating center laboratory, as well as the immediately next smear-negative slide. The slides were labelled with a different identification,

re-stained and re-read in blinded manner using two different examination schemes: (A) Two lengths at 200X magnification with 400X confirmation, and (B) one or two lengths at 400X. Two distinct LED devices, TK-LED and Primostari-LED (Carl Zeiss, Jena, Germany), were used to re-read these slides in a blinded manner. The decision of enriching our sample with low positive smears (50% of scanty and 50% of negative slides) was made in an effort to target those slides most at risk of being missed by the different reading schemes, in case there would be any difference in the accuracy of both checking diagrams. We chose to evaluate the schemes by using the Zeiss device in conjunction with TK-LED microscope considering the wide acceptance of the Zeiss microscope in global evaluations.

### End-user appraisal

A qualitative end-user appraisal survey was conducted among laboratory technicians after approximately three months of experience with LED-FM. The questionnaire included rating of signal-noise ratio, uniformity and intensity of fluorescent illumination, ease of focusing and scale-up suitability.

### Statistical analysis

Sensitivity and specificity values were calculated for FM and ZN using culture as the reference standard for diagnosis specimens. Those specimens contaminated in culture were excluded for the analysis as diagnosis could not be made with certainty. We calculated ZN and FM positivity rates for specimens collected from follow-up patients on anti-tuberculosis treatment.

Statistical analysis was performed using the Epidat 3.1, version (PAHO) and Medcalc (MedCalc Software bvba). Results were considered significant at  $p < 0.05$ . Comparison of sensitivity, specificity and positivity rates in samples from follow-up patients where both methods were applied to the same specimen were done using the McNemar's test. We also calculated positive and negative predictive values with 95% confidence intervals (CI) for each microscopy test.

Subgroups were set by HIV infection and by concentrating or not specimens before smear preparation; a chi-square test was used to compare sensitivities in subgroups.

To compare semi-quantitative microscopy results with LED-FM and ZN, we calculated CI, and statistical significance was defined as non-overlapping 95% CI.

McNemar's test was used to compare ZN and LED-FM positivity obtained by different examination schemes or using different LED devices applied to the same sample of smears.

Ethical review was waived as there was no potential risk to participants' safety, privacy or confidentiality since no formal contact occurred between investigators and participants either directly (interview, questionnaires, etc.) or indirectly (medical records, personal identifiers, etc.). Data on respiratory specimens provided for routine clinical care services were completely anonymized before their inclusion in the study.

## Results

### LED-FM and ZN performance

Out of the 6,637 diagnostic specimens with microscopy results, culture and species confirmation, 869 (12.5%) were culture-positive for *M. tuberculosis* complex. ZN and LED-FM performance in the seven participating laboratories is shown in table 2. Overall, the sensitivity of LED-FM was 11.4% higher than that of ZN (87.7%; 762/869 vs. 76.3%, 663/869; McNemar's test:  $p < 0.001$ ), while the levels of specificity obtained with both methods were high and quite similar (5,764/5,768; 99.9% for

ZN vs. 5,763/5,768; 99.9% for LED-FM; McNemar's test:  $p = 1$ ). We found a statistically significant difference in sensitivity between the two methods in all laboratories (McNemar's test:  $p < 0.05$ ) except for laboratory #5 (McNemar's test:  $p = 0.22$ ). The overall positive and negative predictive values for *M. tuberculosis* detection by LED-FM were 99.4% (95%CI 98.4-99.8) and 98.2% (95%CI 97.8-98.5), respectively, whereas the corresponding values for ZN were 99.4% (95%CI 98.4-99.8) and 96.6% (95%CI 96.0-97.0), respectively.

In follow-up patients, the positivity rate for LED-FM (14.2%; 344/2,419) was 3.2% higher than for ZN (11.0%; 267/2,419;  $p < 0.001$  McNemar's test).

### Diagnostic sensitivity in HIV-infected individuals

Table 3 shows that LED-FM was more sensitive than ZN, irrespective of HIV status ( $p < 0.001$  for the comparison of sensitivity values of LED-FM vs. ZN in both HIV positive or HIV negative/unknown patients, McNemar's test). Overall, both ZN and LED-FM had a lower sensitivity among HIV-infected patients compared with most probably HIV-negative patients (59.4% vs. 80.1% for ZN in HIV-infected patients and HIV-negative patients, respectively, chi-square test:  $p < 0.001$ ; 80.0% vs.

**Table 2.** Comparison of ZN and LED-FM performance for TB diagnosis using culture as reference standard

	TP/C+	Sensitivity	Increase in sensitivity	p value (McNemar's test)	TN/C-	Specificity	p value (McNemar's test)
Laboratory #1							
ZN	69/93	74.2	9.7	0.004	820/821	99.9	1
LED-FM	78/93	83.9			820/821	99.9	
Laboratory #2							
ZN	125/156	79.5	8.3	0.003	1,452/1,453	99.9	1
LED-FM	137/156	87.8			1,452/1,453	99.9	
Laboratory #3							
ZN	163/193	84.5	11.9	<0.001	823/823	100.0	1
LED-FM	186/193	96.4			822/823	99.9	
Laboratory #4							
ZN	47/57	82.5	15.8	0.004	850/850	1	1
LED-FM	56/57	98.2			850/850	1	
Laboratory #5							
ZN	59/88	67.0	5.7	0.22	381/381	1	1
LED-FM	64/88	72.7			380/381	99.7	
Laboratory #6							
ZN	83/108	76.8	10.2	0.01	714/714	1	1
LED-FM	94/108	87.0			714/714	1	
Laboratory #7							
ZN	117/174	67.2	17.4	<0.001	724/726	99.7	1
LED-FM	147/174	84.5			725/726	99.9	
Total of specimens							
ZN	663/869	76.3		<0.001	5,764/5,768	99.9	1
LED-FM	762/869	87.7	11.4		5,763/5,768	99.9	

TP: True positive; C+: *M. tuberculosis* culture-positive specimens; TN: True negative; C-: Culture-negative specimens; ZN: Ziehl-Neelsen; LED-FM: Light emitting diode fluorescence microscopy

**Table 3.** Comparison of the ZN and LED-FM sensitivities stratified by HIV in direct and concentrated smears using culture as reference standard

	Specimens from HIV positive patients				Specimens from negative or unknown HIV status patients				p value (chi square)(a)
	TP	C+	Sensitivity (%)	Increase in sensitivity (%) p value McNemar's test	TP	C+	Sensitivity (%)	Increase in sensitivity (%) p value McNemar's test	
Total smears									
ZN	95	160	59.4		568	709	80.1		<0.001
LED-FM	128	160	80.0	20.6 (<0.001)	634	709	89.4	9.3 (<0.001)	0.002
Direct smears									
ZN	21	38	55.3(b)		525	657	79.9(d)		<0.001
LED-FM	28	38	73.7(c)	18.4 (0.016)	587	657	89.3(e)	9.4 (<0.001)	0.007
Concentrated smears									
ZN	74	122	60.7(b)		43	52	82.7(d)		0.008
LED-FM	100	122	82.0(c)	21.3 (<0.001)	47	52	90.4(e)	7.7 (0.388)	0.24

TP: True positive; C+: *M. tuberculosis* culture-positive specimens; ZN:Ziehl-Neelsen; LED-FM: Light emitting diode fluorescence microscopy  
chi square test for the comparison of ZN and LED-FM sensitivities among HIV positive and negative/unknown patients; results presented for all specimens and stratified by treatment of sample before smear preparation (direct/concentrated smears)

ZN positive in direct smears not significantly lower compared with ZN positive in concentrated smears, chi square test: p=0.69

LED-FM positive in direct smears not significantly lower compared with LED-FM positive in concentrated smears, Chi-square test: p=0.38

ZN positive in direct smears not significantly lower compared with ZN positive in concentrated smears, chi square test: p=0.76

LED-FM positive in direct smears not significantly lower compared with LED-FM positive in concentrated smears, chi square test: p=1.00

89.4% for LED-FM in HIV-positive patients and HIV-negative patients, respectively, chi-square test: p=0.002) (table 3.)

HIV positive and negative culture-positive specimens were stratified according to the method used for smear preparation. As shown in table 3, both ZN and FM sensitivities seemed slightly lower, though not significantly, in direct smears than in concentrated smears; among HIV patients, ZN direct and concentrated smear sensitivities were 55.3% vs. 60.7%, respectively (chi-square test: p= 0.69), whereas values for LED-FM using direct and concentrated smears were 73.7% and 82.0%, respectively (chi-square test: p= 0.38). Similarly, among most probably negative HIV-patients, ZN sensitivity was slightly lower using direct smears (79.9%) in comparison with concentrated smears (82.7%) (chi-square test: p= 0.76), while LED-FM sensitivities using direct or concentrated smears were very similar (89.3% vs. 90.4%, respectively, chi-square test: p=1). In the group of HIV-infected patients, differences between LED-FM and ZN sensitivities remained almost equivalent, regardless if specimens were concentrated or not before smear preparation. On the other hand, although we observed a better LED-FM performance in the group of most probably HIV-negative patients using direct or concentrated smear as compared with ZN, such difference was not statistically significant in the subgroup of concentrated smears (82.7% vs.

90.4% for ZN and LED-FM sensitivities, respectively; McNemar's test: p=0.39), possibly due to the small number of culture-positive specimens available in this category, which resulted in wide confidence intervals around estimates of diagnostic sensitivity.

#### Comparison of microscopy results with LED-FM and ZN

A total of 227 specimens had discrepant results: 25 slides were positive using ZN and negative using LED-FM. Another 202 slides that were positive in LED-FM were reported negative using ZN (table 4).

When low positive smears (scanty and +) were analyzed, 197 of the 504 (39.1%, 95% CI 34.9-43.4%) detected by LED-FM were negative by ZN, while 25 of the 361 (6.9%, 95% CI 4.7-10.2%) detected by ZN were negative by LED-FM.

**Table 4.** Comparison of microscopy results with LED-FM and ZN

ZN	LED-FM					Total
	Negative	Scanty	1+	2+	3+	
Negative	7,920	154	43	5	0	8,122
1+	25	85	175	75	1	361
2+	0	3	35	130	85	253
3+	0	2	7	51	260	320
Total	7,945	244	260	261	346	9,056

ZN: Ziehl-Neelsen

LED-FM: Light emitting diode fluorescence microscopy

Overall, there was an increase in the proportion of positivity in all categories of smear quantification with the use of LED-FM; of the 9,056 specimens included in the study, the number of positives increased from 361 slides (4.0%; CI 3.6-4.4%) with ZN to 504 smears (5.6%; CI 5.1-6.1%) with LED-FM for low positive smears, and from 573 slides (6.3%; CI 5.8%-6.8%) with ZN to 607 smears (6.7%; CI 6.2-7.2%) with LED-FM for high positive smears (++ and +++).

### Comparison of examination schemes

There was no difference in smear-positive detection yield between TK-LED and Primostari-LED; (McNemar's test:  $p=1$ ) (table 5). On the contrary, the proportion of positivity with both microscopes was significantly higher when using reading scheme A (two length at 200x/ 400x for confirmation) in comparison with examining one or two lengths at 400x magnification (scheme B) (table 5).

### End-user appraisal

All the fourteen technicians participating in the study gave positive feedback on TK-LED device signal-noise ratio, uniformity of fluorescent illumination and ease to focus. All believed that the use of LED-FM could improve examination speed and that the TK-LED microscope could be used without a darkroom. All technicians said that LED-FM could be scaled up, and twelve thought that laboratories with a big daily workload should be given priority in the employment of LED-FM. No technical problems were reported during the 36 months of TK-LED device usage both for the study and in routine practice in two laboratories.

### Discussion

Our findings further confirm the previously reported better performance of LED-FM over the conventional ZN technique (19,20,21). A significant increased sensitivity of LED-FM over ZN was found in all laboratories except in laboratory #5. Although

it is well known that microscopy performance is highly dependent upon factors such as the setting and the population attended in the service (22,23), we identified no factor that could bias the results in favor of ZN performance in laboratory #5. On the other hand, it is unlikely that such result could be explained by a poor proficiency of the technicians working in this service, as they showed an acceptable performance during the training phase and the rechecking process. Furthermore, given the small sample size in this laboratory, the power of the statistical test was about 35%, which suggests that there was not a very high chance of detecting differences between both tests, even though LED-FM showed a higher sensitivity.

Among HIV patients, two relevant studies (7,8) performed with conventional FM reported increased sensitivity over ZN. Nevertheless, although published studies have shown that LED microscopy works as well as conventional FM, both in research and in operational settings (19,24,25), the few studies evaluating LED-FM utility for diagnosing TB in HIV-infected people have shown doubtful results. Two studies (9,11) have reported a similar sensitivity of LED-FM compared to ZN, and one of them, conducted in Indonesia(11), showed that FM was less specific than ZN. Conversely, our results are in line with those performed with conventional FM, showing that among HIV-positive TB patients, the difference in sensitivity between LED-FM and ZN (20.6%) doubled that obtained in the group of TB patients with negative or unknown HIV status (9.3%). However, a recent report (26) showed that LED-FM sensitivity in the HIV-infected population continued to be lower than that obtained in most probably HIV-negative patients, possibly due to the higher occurrence of paucibacillary TB in HIV population and the difficulties in obtaining good quality sputum specimens in advanced cases (27). As various methods of concentrating sputum based on centrifugation have been shown to increase

**Table 5.** Smear-positive yield in 160 slides read using different reading schemes and two LED devices

	Number of positive smears among 160 slides (%)			P value (McNemar's test) (a)
	Two lengths at 200x 400X for confirmation (A)	One length at 400X (B <sub>1</sub> )	Two lengths at 400X (B <sub>2</sub> )	
iLED positivity	79 (49.4)	39 (24.4)	53 (33.1)	<0.05
TK-LED positivity	79 (49.4)	38 (23.8)	54 (33.8)	<0.05
p value (McNemar's test) (b)	1.00	1.00	1.00	NA

NA: Not applicable

(a) p values for the comparison of the proportion of positivity using A reading scheme with both B1 and B2 schemes

(b) p values for the comparison of the proportion of positivity obtained by i-LED and that obtained with TK-LED using different reading schemes

diagnostic yield when used prior to microscopy (28), the use of direct or concentrated smears could behave as a confounding factor when evaluating LED-FM performance in different populations.

In agreement with results recently reported by Getachew, *et al.*(12), when we stratified smears by their direct/concentrated state, the diagnostic superiority of LED-FM over ZN remained equivalent. FM appears to be a more sensitive technique than ZN due to its ability to detect low bacillary load in the sputum, as previously reported (11,21). In accordance with these studies, we found that the use of LED-FM significantly increased the proportion of low positive smears in about 40.0% compared with ZN. A stronger absorbability of mycolic acid by auramine-O than by fuchsin would partially explain the increased sensitivity of LED-FM for AFB. Furthermore, according to results by other researchers (20,29), applying both microscopy techniques to follow-up sputum, expected to have an increased proportion of scanty results compared to diagnostic sputum (30), the positivity rate with LED-FM was significantly higher than with ZN. Other factors that contribute to this higher performance of LED-FM, such as improvement in the proficiency of the laboratory technicians due to additional training in FM and new microscopes, may have played a role to a lesser extent, especially considering that one of the conditions for including a laboratory in this multicenter study was an acceptable performance in the ZN external quality assessment during the last three years.

We found that even LED-FM had a higher sensitivity than ZN, as 25 ZN-positive specimens resulted negative by LED-FM. This may be explained by two phenomena: First, as AFB are not homogeneously distributed in sputum, the portion of sputum used to prepare ZN-stained slide may have contained them, whereas the portion used to prepare the slide stained with auramine may have not, especially in those specimens with scarce bacilli. On the other hand, the uneven distribution of AFB on the slide may also explain this phenomenon; as technicians can only observe a proportion of fields on a slide, some AFB may have not been detected simply because the technicians examined those fields that were randomly AFB-depleted; this can explain why different laboratory professionals examining the same number of fields on a slide may get differing results, as it has been previously reported (31).

The larger field area subject to examination using FM compared to the oil immersion fields needed when ZN is used may also explain FM higher

sensitivity. The field of view when a 20x objective is used is three to four times larger than that of the 40x objective and 25 times larger than that of the 100x objective used for ZN microscopy (32). Accordingly, we found that, in agreement with Kubica's study (33) using conventional FM, scanning with 200x magnification enabled a higher positivity yield than examining smears at 400x only, while AFB remained clearly visible with both of the stand alone FM systems used in this study. On the contrary, other authors have reported that using two LED modules mounted on routine microscopes screening smears under 200x magnification did not increase sensitivity compared to screening under 400x magnification (34,35). These authors also reported that with these devices AFB were less clearly visible under 200x compared to 400x magnification, which may explain the differences between their results and ours when LED-FM technology but different devices were evaluated.

The impossibility of comparing TK-LED and Primostari-Led performance was a limitation of our study. To ensure a more precise comparison of positive detection by the two LEDs using different reading schemes, we analyzed a random selection of low positives and the same number of negatives detected with TK-LED. In this small fraction of TK-LED negative slides, no false negatives were detected using the i-LED device. However, given the low proportion of negatives evaluated with both microscopes, it does not seem unreasonable to assume that no TK-LED false-negatives would have been detected if all the negatives had been reread with the i-LED microscope. In these circumstances we were able to compare the detection capacity with the two reading schemes, but not the overall performance of the two LED devices.

Concerns have been voiced regarding the possibility of false positive smears with LED-FM (due to impurities in auramine, food particles and artifacts which produce some fluorescence), and it has been suggested that all scanty and doubtful cases must be confirmed by ZN (36). However, this tends to oversee the increased sensitivity and efficiency gained with the use of LED-FM, which some experts have recommended to discourage (37). The level of specificity of LED-FM in our study was high and similar to that obtained with ZN. Conversely, in their evaluation of LED-FM in HIV-infected patients, Chaidir, *et al.* (11), reported a significantly lower specificity compared to ZN microscopy, and they pointed out that false positive LED-FM results may have been due to lack of experience or training

among technicians. Albert, *et al.* (9), reported a marked difference in the specificity of LED-FM among readers recently trained to evaluate LED-FM performance in HIV-infected patients, which highlights the importance of implementing careful quality assurance measures when a new technology is introduced.

Our study had these additional limitations: (i) it was performed by specimen and not by patient, and while this is consistent with most other studies in this field, we acknowledge that the lack of independence between specimens from the same patient may have led to overestimate accuracy, and (ii) HIV testing was not done systematically as part of the study; according to laboratory records, no HIV status had been registered for a significant number of patients, which underpowered the result analysis by HIV status.

Regarding feasibility aspects, we confirmed the wide acceptance of LED-FM by technicians and the possibility of using it without a dark room. We also found that new national instruments worked well during the first three years. These are all very significant factors in scaling-up LED-FM in national TB programs with limited resources.

To conclude, our findings confirmed LED-FM better performance compared to ZN in HIV-infected patients as previously recorded for conventional FM. Furthermore, user appraisal supported LED-FM rapid roll-out, especially when the burden of HIV-infected population is high. The use of 20x objective for screening was essential to achieve increased sensitivity. WHO has recently endorsed the implementation of Xpert MTB/RIF assay as the first initial TB screening in HIV patients (38), however, microscopy is still needed for treatment monitoring. In their comparison of LED-FM and Xpert MTB/RIF assay in HIV patients, Álvarez-Uria, *et al.* (39), reported that although the molecular assay showed an increase in positive results in comparison with LED-FM when performing both tests in the same specimen, this increase was only modest when analyzing two specimens by LED-FM. Besides, the cost of the equipment, the annual maintenance and the consumables are considerably higher for the Xpert MTB/RIF assay, and this could hinder its use in some resource-limited settings. The 2015 TB Report (40) granted that LED-FM adoption remained low; in 2014, this technology was reported to be present in only 2% of microscopy centers in the Region of the Americas. In this sense, we hope our findings are useful to increase the implementation

of this technology. Particularly in Argentina, the operational and technical evidences we provided will be a valuable input in the preparation of a national strategic plan to expand the use of LED-FM.

### Acknowledgments

Group of Implementation of Fluorescence Microscopy: Mónica Boutonnet<sup>2</sup>, Viviana Caserío<sup>2</sup>, Ana Etchart<sup>3</sup>, Sandra Fajardo<sup>2</sup>, Mónica García<sup>5</sup>, Noemí Gomez<sup>4</sup>, María Gustincic<sup>6</sup>, Viviana Izquierdo<sup>3</sup>, Arnaldo Jara<sup>4</sup>, Graciela Kozicky<sup>2</sup>, Mario Matteo<sup>5</sup>, Carlos Pellegrini<sup>2</sup>, Silvia Pellegrino<sup>4</sup>, Sebastián Pérez-Catalán<sup>6</sup>, Carina Sacramone<sup>4</sup>, Gabriela Santiso<sup>6</sup>, Sandra Vilche<sup>1</sup>, Daniel Eletti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Emilio Coni", ANLIS "C.G. Malbrán", Santa Fe, Argentina

<sup>2</sup> Dirección de Bioquímica de la Municipalidad de Rosario, Rosario, Argentina

<sup>3</sup> Hospital San Roque, San Salvador de Jujuy, Argentina

<sup>4</sup> Laboratorio Central de Salud Pública, Resistencia, Argentina

<sup>5</sup> Hospital "Dr. Francisco Javier Muñiz", Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

<sup>6</sup> Hospital Interzonal General de Agudos "Evita", Lanús, Argentina

<sup>7</sup> Hospital Rawson, Córdoba, Argentina

### Conflicts of interest

The authors have declared that no conflicts of interest exist.

### Financial support

This study received financial support from the *Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica* through its Public Health Service grants (PAE-PID-2007-00127).

### References

1. **World Health Organization.** Fluorescent Light-Emitting Diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis: Policy statement. Accessed: February 4, 2016. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44602/1/9789241501613\\_eng.pdf?ua=1&ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44602/1/9789241501613_eng.pdf?ua=1&ua=1)
2. **Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al.** Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: A systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:570-81.
3. **Bennedsen J, Larsen SO.** Examination of tubercle bacilli by fluorescence microscopy. *Scand J Respir Dis.* 1966;47: 114-20.

4. **Gordon C, van Deun A, Lumb R.** Evaluating the performance of basic fuchsin for the Ziehl-Neelsen stain. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009;13:130-5.
5. **van Deun A, Hossain M A, Gumusboga M, Rieder H L.** Ziehl Neelsen staining: Theory and practice. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12:108-10.
6. **Lumb R, van Deun A, Kelly P, Bastian I.** Not all microscopes are equal. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006;10:227-9.
7. **Kivihya-Ndugga LE, van Cleeff MR, Githui WA, Nganga LW, Kibuga DK, Odhiambo JA, et al.** A comprehensive comparison of Ziehl-Neelsen and fluorescence microscopy for the diagnosis of tuberculosis in a resource-poor urban setting. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003;7:1163-71.
8. **Prasanthi K, Kumari AR.** Efficacy of fluorochrome stain in the diagnosis of pulmonary tuberculosis co-infected with HIV. *Indian J Med Microbiol.* 2005;23:179-81.
9. **Albert H, Nakiyingi L, Sempa J, Mbabazi O, Mukkada S, Nyesiga B, et al.** Operational implementation of LED fluorescence microscopy in screening tuberculosis suspects in an urban HIV clinic in Uganda. *PLoS One.* 2013;8:e72556. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072556>.
10. **Whitelaw J, Peter H, Sohn D, Viljoen G, Theron M, Badri V, et al.** A comparative cost and performance of light-emitting diode microscopy in HIV-tuberculosis-coinfected patients. *Eur Respir J.* 2011;38:1393-7. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00023211>
11. **Chaidir L, Parwati I, Annisa J, Muhsinin S, Meilana I, Alisjahbana B, et al.** Implementation of LED fluorescence microscopy for diagnosis of pulmonary and HIV-associated tuberculosis in a hospital setting in Indonesia. *PLoS One.* 2013;8:e61727. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061727>
12. **Getachew K, Abebe T, Kebede A, Mihret A, Melkamu G.** Performance of LED fluorescence microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV positive individuals in Addis Ababa, Ethiopia. *Tuberc Res Treat.* 2015;2015:794064. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/794064>
13. **Bonnet M, Gagnidze L, Guerin PJ, Bonte L, Ramsay A, Githui W, et al.** Evaluation of combined LED-fluorescence microscopy and bleach sedimentation for diagnosis of tuberculosis at peripheral health service level. *PLoS One.* 2011;6:e20175. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020175>
14. **Imaz MS, Sequeira MD.** Bacteriological diagnosis of tuberculosis in Argentina: Results of a national survey. *Cad Saúde Pública.* 2007;23:885-96. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2007000400016>
15. **Zerbini E, Chirico MC, Salvadores B, Amigot B, Estrada S, Algorry G.** Delay in tuberculosis diagnosis and treatment in four provinces of Argentina. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12:63-8.
16. **Ministerio de Salud de Argentina.** Manual para el diagnóstico bacteriológico de tuberculosis. Parte II. Cultivo. Buenos Aires: Ministerio de Salud; 2007.
17. **Ministerio de Salud de Argentina.** Manual para el diagnóstico bacteriológico de tuberculosis. Parte I. Baciloscopia. Santa Fe: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "E. Coni"; 2012.
18. **Rieder H L, van Deun A, Kam K M, Kim S J, Chonde T M, Trébuq A, et al.** Priorities for tuberculosis bacteriology services in low-income countries. Second edition. Paris: International Union against Tuberculosis and Lung Disease; 2007.
19. **van Deun A, Chonde M, Gumusboga M, Rienthong S.** Performance and acceptability of the FluoLED Easy module for tuberculosis fluorescence microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12:1009-14.
20. **Xia H, Song YY, Zhao B, Kam K-M, O'Brien RJ, Zhang Z, et al.** Multicentre evaluation of Ziehl-Neelsen and light-emitting diode fluorescence microscopy in China. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013;17:107-12. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.12.0184>
21. **Reza LW, Satyanarayana S, Enarson DA, Kumar AMV, Sagili K, Kumar S, et al.** LED-Fluorescence microscopy for diagnosis of pulmonary tuberculosis under programmatic conditions in India. *PLoS ONE.* 2013;8:e75566. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075566>
22. **Perkins M D, Roscigno G, Zumla A.** Progress towards improved tuberculosis diagnostics for developing countries. *Lancet.* 2006;367:942-3.
23. **Mambo-Muvunyi C, Masaisa F, Bayingana C, Musemakwari A, Mutesa L, Carbonell-Hernández T.** Prevalence and diagnostic aspects of sputum smear positive tuberculosis cases at a tertiary care institution in Rwanda. *Afr J Microbiol Res.* 2010;4:88-91.
24. **Marais BJ, Brittle W, Painczyk K, Hesselting AC, Beyers N, Wasserman E, et al.** Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clin Infect Dis.* 2008;47:203-7.
25. **Trusov A, Bumgarner R, Valijev R, Chestnova R, Talevski S, Vragoterova C, et al.** Comparison of Lumin LED fluorescent attachment, fluorescent microscopy and Ziehl-Neelsen for AFB diagnosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;13:836-41.
26. **Chang EW, Page AL, Bonnet M.** Light-emitting diode fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis: A meta-analysis. *Eur Respir J.* 2016;47:929-37. <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.00978-2015>
27. **Elliott AM, Halwiindi B, Hayes RJ, Luo N, Tembo G, Machiels L, et al.** The impact of human immunodeficiency virus on presentation and diagnosis of tuberculosis in a cohort study in Zambia. *J Trop Med Hyg.* 1993;96:1-11.
28. **Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al.** Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: A systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:664-74. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70602-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70602-8)
29. **Thapa B, Reza LW, Kumar AM, Pandey A, Satyanarayana S, Chadha S.** Light Emitting Diode Fluorescence Microscopy increased the detection of smear-positives during follow-up of tuberculosis patients in India: Program implications. *BMC Res Notes.* 2015;8:596. <http://dx.doi.org/10.1186/s13104-015-1584-z>
30. **Otero L, van Deun A, Agapito J, Ugaz R, Prellwitz G, Gotuzzo E, et al.** Quality assessment of smear microscopy by stratified lot sampling of treatment follow-up slides. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15:211-6.

31. **APHL/CDC/IUATLD/KNCV/RIT/WHO.** External quality assessment for AFB smear microscopy. Washington, D.C.: APHL; 2002.
32. **Smithwick RW.** Laboratory manual for acid-fast microscopy. Atlanta, GA, USA: US Public Health Service; 1976.
33. **Kubica GP.** Correlation of acid-fast staining methods with culture results for mycobacteria. *Bull Int Union Tuberc.* 1980;55:117-24.
34. **Affolabi D, Torrea G, Odoun M, Senou N, Ali Ligali M, Anagonou S, et al.** Comparison of two LED fluorescence microscopy build-on modules for acid-fast smear microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010;14:160-9.
35. **Bonnet M, Gagnidze L, Githui W, Guerin PJ, Bonte L, Varaine F, et al.** Performance of LED-based fluorescence microscopy to diagnose tuberculosis in a peripheral health centre in Nairobi. *PLoS ONE.* 2011;6:e17214. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017214>.
36. **Das D, Selvakumar N.** Can LED fluorescence microscopy replace Ziehl-Neelsen microscopy in tuberculosis detection? *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012;16:1558. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.12.0407>
37. **van Deun A, Cattamanchi A, Davis JL, Ridderhof J.** In reply. Can LED fluorescence microscopy replace Ziehl-Neelsen microscopy in tuberculosis detection? *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012;16:1558-9. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.12.0407-2>.
38. **World Health Organization.** Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test. WHO/HTM/TB/2011.2. Geneva: WHO; 2011. Accessed: February 4, 2016. Available from: [http://www.who.int/tb/features\\_archive/xpert\\_rapid\\_tb\\_test/en/](http://www.who.int/tb/features_archive/xpert_rapid_tb_test/en/)
39. **Álvarez-Uria G, Azcona JM, Midde M, Naik PK, Reddy S, Reddy R.** Rapid diagnosis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in HIV-infected patients. Comparison of LED fluorescent microscopy and the Gene Xpert MTB/RIF assay in a District hospital in India. *Tuberc Res Treat.* 2012;932862. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/932862>
40. **World Health Organization.** Twentieth global report on tuberculosis. WHO/HTM/TB/2015.22. Geneva: World Health Organization; 2015. Accessed: February 15, 2016. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf).

ARTÍCULO ORIGINAL

## Supervivencia de receptores de trasplante renal en Colombia, 2008-2012

Karime Osorio-Arango<sup>1</sup>, Mauricio Beltrán-Durán<sup>2</sup>, Yazmín Arias-Murillo<sup>3</sup>, Franklyn Prieto<sup>4</sup>, Adriana Robayo<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Subdirección Nacional de Trasplantes y Bancos de Sangre, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>3</sup> Coordinación Red Nacional de Donación y Trasplantes, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>4</sup> Consultoría Tephinet, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>5</sup> Asociación Colombiana de Nefrología e Hipertensión Arterial, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** La Red Nacional de Donación y Trasplantes del Instituto Nacional de Salud reportó que durante 2014 se realizaron en Colombia 1.059 trasplantes de órganos, de los cuales 761 fueron de riñón y, de estos, 643 (84,5 %) correspondieron a órganos provenientes de cadáveres.

**Objetivo.** Describir las características sociodemográficas de los pacientes con trasplante renal y los resultados en términos de supervivencia.

**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio observacional y retrospectivo de cohorte mediante el análisis de la base nacional de datos de receptores de trasplante renal. Se estimó la supervivencia global con el método de Kaplan-Meier, se compararon las curvas según sexo, edad, tipo de donante, tipo de régimen de afiliación al sistema de salud y tiempo en lista de espera mediante la prueba de hipótesis de Mantel-Cox (*log rank*) y una regresión de Cox.

**Resultados.** De los 3.980 pacientes incluidos en el estudio, 338 fallecieron según el Registro Único de Afiliados. Con una mediana de seguimiento de 49 meses, la supervivencia global fue de 6,35 años (IC<sub>95%</sub> 6,30-6,40), la supervivencia al año del trasplante fue de 97,2 %, a los tres años, de 93,2 %, y a los cinco años, de 90,8 %. La supervivencia fue mayor en los pacientes menores de 50 años receptores de trasplante con donante vivo y con menos de seis meses en lista de espera.

**Conclusiones.** Los resultados reflejaron el panorama de los pacientes con trasplante renal en el país en términos de supervivencia, lo cual sirve de base para estudios prospectivos con seguimiento estricto.

**Palabras clave:** insuficiencia renal crónica; trasplante de riñón; supervivencia; donantes de tejidos; Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3246>

### Survival in renal transplant recipients in Colombia, 2008-2012

**Introduction:** The *Red Nacional de Donación y Trasplantes* of the Colombian *Instituto Nacional de Salud* reported that in 2014, 1,059 organ transplants were performed, of which 761 were kidney transplants, and 643 (84.5%) of these were from cadaveric organ donors.

**Objective:** To describe the socio-demographic characteristics of patients who received renal transplants, as well as their outcomes in terms of survival.

**Materials and methods:** National kidney transplants were analyzed through an observational retrospective cohort study. Overall survival was estimated using the Kaplan-Meier method. The survival curves by sex, age, type of donor, type of insurance, and time on the waiting list were compared utilizing the log rank hypothesis and a Cox regression.

**Results:** A total of 3,980 patients were included, of whom 338 died according to the Registry of Affiliates. The median follow-up time was 49 months, overall survival was 6.35 years (95% CI: 6.30 to 6.40), the one-year survival following transplantation was 97.2%, the three-year survival, 93.2%, and the five-year survival, 90.8%. The survival rate was higher in patients under 50 years of age, receptors of living donor transplants, and with less than six months on the waiting list.

#### Contribución de los autores:

Karime Osorio-Arango: consolidación de la información, validación de datos, análisis epidemiológico y discusión de resultados

Mauricio Beltrán-Durán: análisis epidemiológico y discusión de resultados

Yazmín Arias-Murillo: discusión de resultados

Franklyn Prieto: análisis epidemiológico

Adriana Robayo: discusión de resultados

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

**Conclusions:** The results obtained serve as the basis for future studies with strict monitoring of survival among kidney transplant recipients in Colombia.

**Key words:** Renal insufficiency, chronic; kidney transplantation; survival; tissue donor, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3246>

El trasplante de órganos es uno de los procedimientos que permiten salvar vidas en todo el mundo, sin embargo, su accesibilidad es limitada debido al escaso número de donantes. Se le considera el tratamiento de elección para pacientes con insuficiencia renal crónica terminal debido a su clara ventaja frente a otras formas de tratamiento sustitutivo en cuanto a la calidad de vida de los pacientes, su reincorporación a la vida productiva, la supervivencia y los costos (1-7).

Según reportes del Observatorio Global de Donación y Trasplante, en el 2013 se hicieron 78.952 trasplantes de riñón en el mundo, de los cuales 30.614 se hicieron en el continente americano; en 63,1 % de estos, los órganos provenían de cadáveres (8). La Red Consejo Iberoamericano de Donación y Trasplantes (RCIDT) reportó que en el 2014 se hicieron en Latinoamérica 11.770 trasplantes de riñón, 34,6 % de los cuales se hizo con órganos de donante vivo (9). La Red Nacional de Donación y Trasplantes del Instituto Nacional de Salud reportó que durante el 2014 se realizaron en Colombia 1.059 trasplantes de órganos, 761 de ellos de riñón, en 643 (84,5%) de los cuales los órganos provenían de cadáveres (10).

La supervivencia global se define como el tiempo que transcurre desde el inicio del tratamiento hasta su resultado. Entre los receptores de trasplante renal la supervivencia puede verse afectada por diferentes factores como la edad, el sexo del receptor, el tipo de donante, la enfermedad renal primaria, las enfermedades concomitantes, el tiempo previo de diálisis, el tiempo de isquemia fría, la necrosis tubular aguda, la calidad del órgano que se trasplanta y, especialmente, la aparición de rechazo agudo.

En varios estudios en Colombia se ha caracterizado a los pacientes con trasplante renal. En el estudio llevado a cabo en el Hospital Universitario Ramón González de Bucaramanga entre 1981 y 1990 con

76 pacientes, se describieron las características clínicas del rechazo en los 66 episodios de este tipo registrados y se encontró una supervivencia de 86,9 % al año del trasplante, de 83,3% a los dos y de 66,6% a los cinco (11). En un estudio más reciente en la Clínica Shaio de Bogotá, se describieron las características generales de una cohorte de pacientes con trasplante renal y se analizaron las diferencias de supervivencia del injerto y del paciente (12).

El presente estudio describe las características demográficas de los pacientes con trasplante renal en Colombia entre 2008 y 2012, y su supervivencia después del procedimiento, así como la relación de esta con diversas variables de interés en el contexto de la Red Nacional de Donación y Trasplantes.

### Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio observacional de cohorte retrospectiva con la información de la base nacional de datos de receptores de trasplante renal. La población de estudio incluyó a todos los pacientes receptores de trasplante renal entre 2008 y 2012 registrados en el sistema de información de la Red Nacional de Donación y Trasplantes del Instituto Nacional de Salud, por lo cual no se requirió un muestreo. Se excluyeron los pacientes que tuvieron que recibir un nuevo trasplante, así como aquellos que recibieron trasplantes combinados.

El fallecimiento se definió como el hecho de interés y la "censura" como el estado de "vivo" de un paciente a la fecha de corte, es decir, el 30 de septiembre de 2014, la cual correspondía al periodo para el cual se contaba con los datos de defunción. La supervivencia se determinó como el tiempo en días entre el trasplante renal y la muerte del paciente o su estado de "vivo".

Además de los datos del sistema de información de la Red Nacional de Donación y Trasplantes del Instituto Nacional de Salud, se utilizó la bodega de datos del Sistema Integral de Información de la Protección Social del Ministerio de Salud y Protección Social (SISPRO), la cual cuenta con el Registro Único de Afiliados. El Registro Único de Afiliados es un sistema de información que contiene el registro de los afiliados al Sistema Integral de Seguridad Social en salud, pensiones

#### Correspondencia:

Karime Osorio-Arango, Subdirección Nacional de Trasplantes y Bancos de Sangre, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: (571) 220 7700, extensión 1567

[losorio@ins.gov.co](mailto:losorio@ins.gov.co); [lkarime15@gmail.com](mailto:lkarime15@gmail.com)

Recibido: 01/03/16; aceptado: 21/07/16

y riesgos profesionales, de los beneficiarios de subsidio familiar, de cesantías y de los programas ofrecidos a través de la red de protección social. El Registro Único de Afiliados contiene un módulo de nacimientos y defunciones, el cual se utilizó como fuente de información sobre el estado vital de los pacientes y la fecha de defunción en los casos correspondientes.

### **Variables**

Las variables incluidas fueron la edad, el sexo, el grupo sanguíneo, el municipio de residencia, el régimen de afiliación al sistema de salud, la regional que originó el reporte, el tiempo en lista de espera, el tipo de donante y el estado vital.

La variable “regional” se refiere a la división geográfica según el área de prestación de los servicios de donación y trasplantes; según la normatividad vigente, el país está dividido en seis regionales: regional 1 (Bogotá), regional 2 (Medellín), regional 3 (Cali), regional 4 (Bucaramanga), regional 5 (Barranquilla), y regional 6 (Neiva) (13).

La variable “edad” incluyó las siguientes categorías: pacientes pediátricos (menores de 15 años) y adultos (de 15 años o más), así como aquellos pacientes en edades con menor y mayor probabilidad de complicaciones, o sea, menores de 50 años y de 50 años o más.

En la variable “tiempo en lista de espera” se establecieron dos categorías: mediana de días en lista de espera y menos de seis meses o seis meses o más en lista de espera.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se hizo en tres etapas. En la primera, se describieron las variables utilizando el cálculo de medidas de tendencia central y de dispersión para las variables cuantitativas, y el cálculo de frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas. Además, se caracterizó por tipo de donante de acuerdo con las variables de sexo, edad, regional de reporte y tiempo en lista de espera. En la segunda etapa, se hizo un análisis de supervivencia con el método de Kaplan-Meier mediante el cual se estimó la supervivencia global y se compararon las curvas según sexo, edad, tipo de donante, tipo de régimen de afiliación al sistema de salud y tiempo en lista de espera, utilizando la prueba de hipótesis de Mantel-Cox. Durante la tercera etapa, se hizo un análisis multivariado en el cual se ajustó un modelo de regresión no paramétrico de riesgos proporcionales de Cox para

medir la relación de la supervivencia con las variables independientes que mostraron hipótesis *log rank* significativas en el análisis bivariado.

Se escogió el modelo más parsimonioso usando el método “introducir”, el cual correspondió al del menor número de las variables más precisas y válidas. Para todas las pruebas de hipótesis, se consideró significativo que el intervalo de confianza de 95 % (IC<sub>95%</sub>) no pasara de uno, es decir, un valor de *p* menor de 0,05. Los datos se analizaron con el programa IBM SPSS Statistics 22<sup>®</sup> con licencia del Instituto Nacional de Salud.

### **Consideraciones éticas**

Este es un estudio retrospectivo que utilizó información secundaria; se utilizaron los datos de los receptores de trasplante renal, los cuales se ingresan en el sistema de información de la Red Nacional de Donación y Trasplantes en cumplimiento de la normatividad vigente. No se hizo ninguna intervención ni modificación intencionada de variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos participantes, por lo cual el estudio se clasificó como investigación sin riesgo según lo establecido en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud. La confidencialidad de la información se protegió según los lineamientos establecidos y la normatividad vigente para la Red Nacional de Donación y Trasplantes (13).

### **Resultados**

Entre el 2008 y el 2012, 4.060 pacientes recibieron trasplante de riñón; de ellos, 3.980 cumplían con los criterios de inclusión en el estudio. De los pacientes excluidos por haber recibido trasplante combinado, el 55,3 % era receptor de trasplante de riñón e hígado, el 42,1 %, de riñón y páncreas, y el 2,6 %, de riñón y corazón. El 60,7 % de los pacientes analizados eran hombres, el rango de edad fluctuó entre uno y 83 años, y la mediana de edad fue de 44 años: 46 en hombres y 40 en mujeres.

Durante el 2010, se hizo el mayor número de trasplantes (22,0 %) y Bogotá fue la regional que reportó el mayor número de ellos en el periodo de estudio (38,7 %). La mayoría de pacientes residía en la capital del país (36,4 %), seguida por Medellín (33,3 %) y Cali (17,7 %). Los pacientes pertenecían principalmente al régimen contributivo (78,3 %) y el grupo sanguíneo de la mayoría fue el O positivo (56,2 %) (cuadro 1).

La mediana de días en lista de espera fue de 107 días, con un mínimo de 0 y un máximo de 6,7 años. En la regional de Medellín se registraron menos

**Cuadro 1.** Características generales de los pacientes con trasplante renal, Colombia, 2008-2012

Parámetros	n	%
Sexo (N=3.980)		
Hombres	2.414	60,7
Mujeres	1.566	39,3
Año (N=3.980)		
2008	680	17,1
2009	854	21,5
2010	875	22
2011	801	20,1
2012	770	19,3
Regional (N=3.980)		
Bogotá	1.539	38,7
Medellín	1.391	34,9
Cali	724	18,2
Bucaramanga	130	3,3
Barranquilla	33	0,8
Neiva	163	4,1
Tipo de sangre (N=3.960)		
A+	1.082	2,1
A-	85	27,3
AB+	70	0,1
AB-	5	1,8
B+	313	0,7
B-	26	7,9
O+	2.237	56,5
O-	142	3,6
Tipo de donante (N=3.980)		
Cadavérico	3.648	91,7
Vivo	332	8,3
Tipo de régimen (N=3.877)		
Contributivo	3.036	78,3
Subsidiado	841	21,7

días en lista de espera, con una mediana de 46 días, y Bogotá presentó el mayor número de días en lista de espera, con 210; los pacientes del grupo sanguíneo A negativo y AB positivo tuvieron el menor tiempo de espera, con una mediana de 49 días en lista, y el tiempo de espera más prolongado correspondió a los pacientes del grupo O positivo, con una mediana de 132 días, y un tiempo máximo de 6,7 años. Según el régimen de afiliación al sistema de seguridad social en salud, los pacientes que pertenecían al régimen subsidiado permanecieron menos tiempo en lista de espera, con una mediana de 73 días, comparados con los del régimen contributivo, con una mediana de 120 días.

La mayor proporción de trasplantes renales se hizo con donante cadavérico (91,7 %), y los receptores eran en su mayoría hombres (61,1 %), con una mediana de edad de 45 años (mínimo de 2 años y máximo de 83). Los pacientes receptores de trasplante proveniente de donante vivo fueron principalmente hombres (55,7 %), con una mediana de edad de 35 años (mínimo de un año y máximo

de 78). Los receptores de trasplante de cadáver residían principalmente en Medellín (36,0 %), en tanto que la mayoría de los receptores de trasplante de donante vivo residía en Bogotá (58,4 %). La mediana de días en lista de espera para receptores de trasplante de donante cadavérico fue de 112 días, con un máximo de 6,7 años de espera, y para los de donante vivo, de 60 días, con un tiempo máximo en lista de cuatro años.

De los pacientes receptores de trasplante de donante vivo, el 90,7 % recibió el órgano de donantes relacionados genéticamente, con una mediana de edad de 33 años (edad mínima de un año y máxima de 72), y el 9,3 %, de donante relacionado emocionalmente, con una mediana de edad de 44,5 años (edad mínima de 20 y máxima de 78); la mediana de días en lista de espera fue de 60 y 63, respectivamente.

### **Análisis de supervivencia**

Según el Registro Único de Afiliados, de los 3.980 pacientes con trasplante incluidos en el estudio, 338 (8,5%) habían fallecido antes del 30 de septiembre de 2014. El 2010 fue el año con el mayor número de defunciones y el 2008 aquel con el menor número.

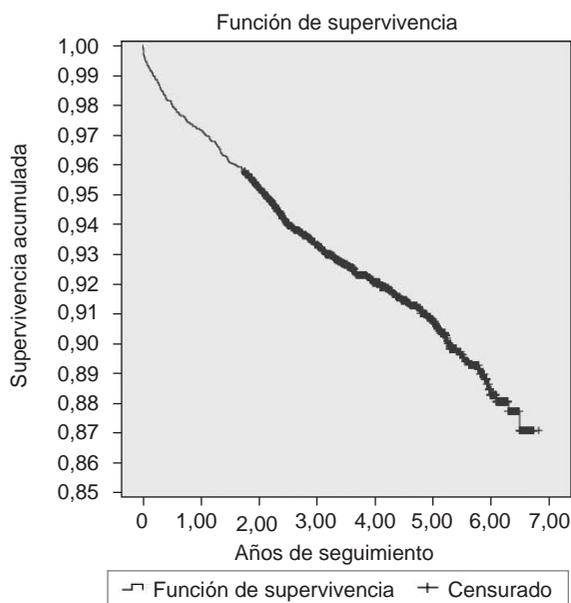
La mediana de edad de defunción de los pacientes con trasplante fue de 55 años: 56 años en hombres y 51 en mujeres. La letalidad general para hombres fue de 8,7 % y para mujeres de 8,1 %, sin registrar diferencias estadísticas ( $p=0,5612$ ).

La mediana de días en lista de espera para los pacientes fallecidos fue de 117 días, con un máximo de tiempo en lista de 6,5 años; la mediana del tiempo transcurrido entre el trasplante y la defunción fue de 20,4 meses.

La letalidad general en los pacientes con trasplante de cadáver fue de 8,82 %, con una mediana de edad de muerte de 55 años y una mediana de días en lista de espera de 119, con un mínimo de 0 y un máximo de 2.375 días (6,5 años). La letalidad general en los pacientes con trasplante de donante vivo fue de 4,81 %, con una mediana de edad de muerte de 45 años y una mediana de días en lista de espera de 73, con un mínimo de 8 y un máximo de 805 días (2,2 años). Las letalidades según tipo de donante mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,0122$ ). De los pacientes receptores de trasplante de donante vivo, el 100 % de los fallecidos había recibido el trasplante de un donante relacionado.

Con una mediana de seguimiento de 49 meses, la supervivencia global fue de 6,35 años (IC<sub>95%</sub> 6,30-6,40); la supervivencia al año de trasplante fue de 97,2 %, a los tres años, de 93,2 % y a los cinco años, de 90,8 % (figura 1).

Al comparar la supervivencia no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las variables de sexo, edad (en las categorías de



**Figura 1.** Supervivencia global de los pacientes con trasplante renal, Colombia, 2008-2012

pacientes pediátricos de 15 años o menos y de mayores de 15 años) o régimen de afiliación; la supervivencia fue mayor en los pacientes menores de 50 años con trasplante de donante vivo y menos de seis meses en lista de espera (cuadro 2).

El análisis multivariado evidenció que los pacientes con trasplante de donante vivo y con menos de seis meses en lista de espera tuvieron una mayor supervivencia (cuadro 3).

## Discusión

En 1965 se hicieron los primeros trasplantes de órganos en Colombia, los cuales fueron de riñón proveniente de donantes con muerte cerebral; posteriormente, en 1973, se hizo el primer trasplante de donante vivo. En el país se han realizado alrededor de 9.000 trasplantes renales desde 1999, según los informes de la Red Nacional de Donación y Trasplantes del Instituto Nacional de Salud (14-21).

Los trasplantes renales y el ingreso de pacientes a la lista de espera deberían haber aumentado, pero en los últimos años se ha evidenciado una disminución en el número de trasplantes coincidente con el descenso en la tasa de donación real a partir del 2010, la cual pasó de 10,5 en ese año a 8,5 en el 2011, hasta llegar a 7,3 en el 2014. Esta situación se debe principalmente a que ha aumentado la negativa de los familiares frente a la donación, así como a las contraindicaciones médicas y legales de los potenciales donantes (10).

**Cuadro 2.** Supervivencia por años

Parámetro	Supervivencia (años)			Log rank	p
	1 (%)	3 (%)	5 (%)		
Sexo					
Hombres	97,0	93,4	91,0	0,21	0,647
Mujeres	97,3	93,6	90,9		
Edad (años)					
<15	98,6	94,9	92,8	1,266	0,260
>15	97,0	93,2	90,8		
<50	98,3	95,3	94,2	72,803	0,000*
>50	95,0	89,8	85,0		
Tipo de donante					
Cadavérico	97,0	93,3	90,5	4,854	0,028*
Vivo	98,2	95,3	94,7		
Vivo relacionado	98,0	94,7	94,2	1,698	0,193
Vivo relacionado emocionalmente	100	100	100		
Régimen de afiliación					
Contributivo	97,2	93,4	91,0	1,212	0,271
Subsidiado	96,8	92,5	89,3		
Tiempo en lista de espera (meses)					
<6	97,8	94,5	91,7	6,716	0,010*
>6	96,1	92,0	89,5		

\* Diferencias estadísticamente significativas

**Cuadro 3.** Modelo de regresión de Cox

	Exp (B)	IC <sub>95%</sub>		p
		Inferior	Superior	
<6 meses en lista de espera	0,752	0,605	0,933	0,010*
Tipo de donante	0,572	0,346	0,945	0,029*

IC<sub>95%</sub>: intervalo de confianza de 95 %Exp (B): *hazard ratio*

En el presente estudio, se encontró un predominio constante de los hombres con trasplante renal durante el periodo analizado, diferencia explicable por el hecho de que la prevalencia de la enfermedad renal crónica en nuestro país es mayor en hombres que en mujeres y, por lo tanto, hay menos mujeres en lista de espera (22).

En cuanto a las ciudades de residencia de los pacientes con trasplante de donante fallecido, se encontró que la mayoría residía en Medellín, lo cual probablemente se relacione con características socioculturales de esta población, en la cual entre el 70 y el 80 % de los familiares aceptan la donación de órganos. Los receptores de trasplante de donante vivo se concentraron principalmente en Bogotá, donde se concentra la mayoría de las instituciones prestadoras de servicios de trasplantes; además, los donantes cadavéricos no alcanzan para cubrir la demanda de pacientes en lista de espera, lo cual favorece que se busquen otras opciones como el trasplante de donante vivo.

En cuanto al tiempo en lista de espera, se encontró que los pacientes receptores de trasplante en la regional de Medellín habían permanecido menos tiempo en lista de espera, probablemente porque los criterios de asignación y distribución de órganos en el país obedecen, en primera instancia, a aspectos geográficos, es decir que al ser Medellín la regional con más donantes, se hicieron allí un mayor número de trasplantes y, consecuentemente, disminuyó la cantidad de pacientes en lista de espera. De igual manera, Bogotá presentó la mayor mediana de tiempo en lista de espera, lo cual se explicaría porque allí la demanda de trasplantes supera la oferta de donantes. En cuanto al tipo de donante, los pacientes receptores de trasplantes de donantes vivos permanecieron en lista de espera casi la mitad del tiempo que los de donante cadavérico, lo cual representa otra ventaja de este tipo de donante. Además, entre estos receptores se registró una tendencia a ser más jóvenes que los receptores de trasplante de donante cadavérico.

A pesar de que los trasplantes de donante vivo ofrecen claras ventajas al paciente, como un menor riesgo de complicaciones después del trasplante, una menor tasa de rechazo y una mejor compatibilidad de antígenos leucocitarios humanos (*Human Leukocyte Antigen*, HLA) (23), en la mayoría de los trasplantes renales en el país los órganos provienen de donantes cadavéricos; debe señalarse, sin embargo, que ha habido un leve aumento de donantes vivos en los últimos años. El número de trasplantes por tipo de donante es muy variable en todo el mundo: en Irán, por ejemplo, más de 90 % de los trasplantes son de donante vivo, en tanto que en Estados Unidos y en Brasil, la proporción entre donantes vivos y cadavéricos es de 50 % (24). En su estudio, Valdivia reporta que la mayoría de trasplantes en Cuba son de cadáveres (60,2 %) (25).

La supervivencia global de los pacientes con trasplante en este estudio fue de 97,2 % al año, de 93,2 % a los tres años y de 90,8 % a los cinco años. Estos resultados difieren de lo reportado en otros estudios. En un estudio en el Hospital Ipol de Malasia llevado a cabo entre el 1° de enero de 1993 y el 1° de junio de 2003 con 91 pacientes, se encontró una supervivencia a los dos y a los cinco años de 93,1 y 77,4 %, respectivamente (26). En un estudio de cohorte en Cuba, el análisis de 88 pacientes que recibieron trasplante entre enero de 1999 y diciembre de 2004 arrojó una supervivencia general de 82,7 % al año, de 78,3 % a los tres años y de 73,4 % a los cinco años, con una media de supervivencia de 4,5 años, la cual fue de 6,35 años en el presente estudio (24). En otro estudio en Colombia, se reportó que la supervivencia global fue de 90,7 % a los 27 años en una cohorte de 323 pacientes y, en el presente estudio, fue de 90,8 % a los cinco años en 3.980 pacientes, diferencia que puede estar relacionada con el tamaño de la población analizada, ya que se incluyeron los trasplantes hechos en las seis regionales que conforman la red, lo cual incide en la diversidad de las características demográficas y clínicas, así como de los tratamientos de inducción y el manejo de infecciones, aspectos que no se tuvieron en cuenta en el presente estudio (12).

La mediana de edad de los pacientes receptores de trasplante se mantuvo estable en el transcurso del periodo de estudio y la supervivencia fue mayor en los pacientes que en el momento del trasplante tenían menos de 50 años, lo cual respondería a que los mayores de 50 tienen mayor probabilidad de presentar enfermedades concomitantes y, por consiguiente, mayor riesgo de complicaciones.

La supervivencia fue mayor en los pacientes que permanecieron menos de seis meses en lista de espera que en quienes superaban este tiempo debido, seguramente, a las complicaciones que pudieron haber surgido en el transcurso de la espera, así como a la obligada prolongación de la diálisis y la aparición de enfermedades concomitantes, entre otras.

Los trasplantes renales en Colombia se hacen principalmente con donantes cadavéricos, y se sabe que en estos casos la supervivencia es menor tanto para el injerto como para los pacientes (23,25). Aunque los trasplantes de donante cadavérico han registrado una disminución progresiva y los de donante vivo han aumentado, la lista de espera sigue creciendo en tanto que el número de órganos disponibles para trasplante ha venido disminuyendo (10).

Los resultados de este estudio fueron levemente superiores a los datos reportados por la *Organ Procurement Transplant Network* para Estados Unidos entre 2008 y 2014, en cuyo reporte se registró una supervivencia al año del trasplante de 94,3 %, a los tres años de 87,7 % y a los cinco años de 80,4 % con donantes cadavéricos, comparados con 97,9, 94 y 89,3 % con donantes vivos, respectivamente (27). En un estudio realizado en México en el 2010 se analizaron 467 pacientes (31 donantes fallecidos y 436 donantes vivos) y se encontró una supervivencia al año de 90,3 % con donante cadavérico y de 96,9 % con donante vivo (1).

Debido a limitaciones del sistema de información, no se pudieron establecer relaciones entre donantes y receptores, ni calcular la supervivencia de los donantes vivos ni establecerla según la correspondencia de los HLA. Tampoco se pudo establecer la causa específica de muerte, de modo que no fue posible evaluar la letalidad específica del trasplante renal ni la supervivencia según el diagnóstico de muerte. Por otra parte, no se sabía cuántos de los pacientes que estaban vivos a la fecha de corte del estudio conservaban el injerto y cuántos habían requerido diálisis de nuevo.

Sin embargo, los resultados obtenidos dan una visión global de la supervivencia de los pacientes receptores de trasplante renal en el país, y pueden servir de base para estudios prospectivos. Es importante resaltar que este tipo de estudios es posible cuando los registros de las instituciones de salud con programas de trasplante están disponibles en los sistemas de información de forma oportuna y con la adecuada calidad.

Es necesario hacer estudios para evaluar la supervivencia del injerto e incluir los episodios de rechazo, y las causas y factores de riesgo asociados, como el tipo de donante, las enfermedades concomitantes, el tiempo de isquemia fría, la compatibilidad HLA, los fármacos inductores administrados y las infecciones, sobre todo las de las vías urinarias y las causadas por citomegalovirus, por estar asociadas al rechazo y la mortalidad global (12,28-30). Además, en futuros estudios deberá evaluarse el efecto del tiempo transcurrido en lista de espera. Las tasas de supervivencia encontradas en este estudio concuerdan con lo reportado en otros e, incluso, estuvieron por encima de algunos de dichos registros.

Por último, es importante resaltar la importancia de contar con una fuente de información como la del Sistema Integral de Información de la Protección Social (SISPRO) del Ministerio de Salud y Protección Social en este tipo de proyectos que pretenden generar información de gran relevancia para el país.

### Agradecimientos

Agradecemos al Centro Regulador de Trasplantes por su apoyo en la recolección de datos, al Sistema Integral de Información de la Protección Social del Ministerio de Salud y Protección Social por los cruces de información, y a la Dirección de Redes en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud por su apoyo en el desarrollo del proyecto.

### 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 con recursos propios del Instituto Nacional de Salud.

### Referencias

1. Ticona AB, Álvarez LE, Jiménez A, Cruz J, Medina C, Meza G, et al. Supervivencia del paciente e injerto renal al año de trasplante de donante fallecido; comparación con resultados de donante vivo. *Revista Mexicana de Urología*. 2010;70:347-53.

2. **Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al.** Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med.* 1999;341:1725-30. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199912023412303>
3. **Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO).** CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2013;3:1-150.
4. **Wei SY, Chang YY, Mau LM, Lin MY, Chiu HC, Tsai JC, et al.** Chronic kidney disease care program improves quality of pre – end stage renal disease care, and reduces medical cost. *Nephrology (Carlton).* 2010;15:108-15. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1797.2009.01154.x>
5. **Smart NA, Titus TT.** Outcomes of early versus late nephrology referral in chronic kidney disease: A systematic review. *Am J Med.* 2011;124:1037-80 e2. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.04.026>
6. **Abecassis M, Bortlett ST, Collins AJ, Davis CI, Delmonico FL, Fredewald JJ, et al.** Kidney transplantation as primary therapy for end – stage renal disease: A National Kidney Foundation/Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF/KDOQI) conference. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3471-80. <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.05021107>
7. **Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B.** Long-term renal allograft survival: Have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant.* 2004;4:1289-95. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00515.x>
8. **Global Observatory on Donation and Transplantation.** Organ Donation and Transplantation Activities 2013. Fecha de consulta: 17 de marzo de 2016. Disponible en: <http://www.transplant-observatory.org/report-2013/>.
9. **Red Consejo Iberoamericano de Donación y Trasplante.** Actividad de donación y trasplante de órganos, tejidos y células y recomendaciones aprobadas por el Consejo Iberoamericano de Donación y Trasplante. Newsletter Vol. IX N° 1, Noviembre 2015. Fecha de consulta: 20 de abril de 2017. Disponible en: <http://www.transplant-observatory.org/download/newsletter-rcidt-2015/>.
10. **Instituto Nacional de Salud.** Red Nacional de Donación y Trasplantes. Informe anual de donación y trasplantes 2014. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2014. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadsticas/Informe%20final%20Red%20Donaci%C3%B3n%20y%20Trasplantes%202014%20v04.pdf>.
11. **Gamarra G, Gómez J.** Rechazo en pacientes con trasplante renal. *Acta Médica Colombiana.* 1991;16:244-55.
12. **Dávila FA, Pareja MJ, Rodríguez ES, Fajardo WR, Luna RD, Flórez KV.** Análisis de supervivencia del trasplante renal (cohorte retrospectiva). *Urología Colombiana.* 2016;1:12-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.uroco.2016.03.005>
13. **Ministerio de la Protección Social.** Decreto número 2493 de 2004. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2014. Disponible en: [http://www.minsalud.gov.co/Normatividad\\_Nuevo/DECRETO%202493%20DE%202004.PDF#search=%252Cdecreto%25202493](http://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/DECRETO%202493%20DE%202004.PDF#search=%252Cdecreto%25202493).
14. **Instituto Nacional de Salud.** Red Nacional de Donación y Trasplantes. Estadísticas trasplantes 2005. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2014. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadsticas/Estadsticas%20trasplantes%202005.pdf>.
15. **Instituto Nacional de Salud.** Red Nacional de Donación y Trasplantes. Estadística donación y trasplantes año 2006. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2014. Disponible en: [http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadsticas/Estadsticas\\_trasplantes%202006.pdf](http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadsticas/Estadsticas_trasplantes%202006.pdf).
16. **Instituto Nacional de Salud.** Red Nacional de Donación y Trasplantes. Información actividad de trasplante Colombia 2007. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2014. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadsticas/Estadsticas%20Trasplantes%202007.pdf>.
17. **Instituto Nacional de Salud.** Red Nacional de Donación y Trasplantes. Informe enero a diciembre de 2008 trasplante de órganos. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2014. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadsticas/INF%20COORD%20NAL%20MINPROT%20ORGANOS%202008.pdf>.
18. **Instituto Nacional de Salud.** Red Nacional de Donación y Trasplantes. Informe red donación y trasplantes 2009. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2014. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadsticas/INF%20COORD%20NAL%20MINPROT%202009.pdf>.
19. **Instituto Nacional de Salud.** Red Nacional de Donación y Trasplantes. Informe red donación y trasplantes 2010. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2014. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadsticas/Informe%20FinalRed%20D%20Tx%20-%202010.pdf>.
20. **Instituto Nacional de Salud.** Red Nacional de Donación y Trasplantes. Informe anual Red de Donación y Trasplantes 2011. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2014. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadsticas/Informe%20Red%20Donacion%20y%20Trasplantes%2020Vol%201%202011.pdf>.
21. **Instituto Nacional de Salud.** Red Nacional de Donación y Trasplantes. Informe anual Red de Donación y Trasplantes 2012. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2014. Disponible en: [http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadsticas/Informe\\_Red%20donacion%20y%20trasplantes%20Vol2\\_2012.pdf](http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadsticas/Informe_Red%20donacion%20y%20trasplantes%20Vol2_2012.pdf).
22. **Cuenta de Alto Costo.** Situación de la enfermedad renal crónica en Colombia 2013. Fecha de consulta: 20 de junio de 2015. Disponible en: [https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/CAC/SITUACION\\_DE\\_LA\\_ENFERMEDAD\\_RENAL\\_CRONICA\\_2013.pdf](https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/CAC/SITUACION_DE_LA_ENFERMEDAD_RENAL_CRONICA_2013.pdf).
23. **Guirado L, Vela E, Cleries M, Díaz JM, Facundo C, García R.** ¿Por qué el trasplante renal de donante vivo da mejores resultados que el trasplante renal de donante cadáver? *Sociedad Española de Nefrología.* 2008;28:159-67.
24. **Valdivia J, Gutiérrez C, Méndez D, Delgado E, Treto R, Fernández I.** Supervivencia en pacientes con trasplante renal. Factores pronósticos. *Invest Medicoquir.* 2013;5:253-275.

25. **Valdivia J, Gutiérrez C, Méndez D, Delgado E, Treto J, Fernández I, et al.** Supervivencia en el trasplante renal con donante vivo y donante fallecido. *Invest Medicoquir.* 2011;3:99-107.
26. **Go KW, Teo SM.** Comparison of patient survival between various subgroups among renal transplant patients: A single center experience. *Transplant Proc.* 2004;36:2046-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.08.103>
27. **U.S. Department of Health & Human Services.** Organ Procurement & Transplantation Network. Liver allocation and distribution policy. Fecha de consulta: 5 de enero de 2015. Disponible en: <http://optn.transplant.hrsa.gov/>.
28. **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;4:250-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2015.10.005>
29. **Arias-Murillo YR, Osorio-Arango K, Cortés JA, Beltrán M.** Seroprevalencia de citomegalovirus en donantes de órganos y receptores de trasplante renal, Colombia, 2010-2014. *Biomédica.* 2016;36(Supl.2):187-93. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2938>
30. **Moreso F, Hernández D.** ¿Ha mejorado la supervivencia del injerto tras el trasplante renal en la era de la moderna inmunosupresión? *Nefrología.* 2013;33:14-26.

ARTÍCULO ORIGINAL

## Determinación del polimorfismo de HLA-A, -B y -DRB1 en donantes de órganos con muerte encefálica representativos de la población general colombiana, 2007-2014

Yazmín Arias-Murillo<sup>1</sup>, Karime Osorio-Arango<sup>2</sup>, Brayan Bayona<sup>3</sup>,  
Guadalupe Ercilla<sup>4</sup>, Mauricio Beltrán-Durán<sup>5</sup>

- <sup>1</sup> Coordinación Red Nacional de Donación y Trasplantes, Dirección Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
- <sup>2</sup> Subdirección Red Nacional de Trasplantes y Bancos de Sangre, Dirección Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
- <sup>3</sup> Centro de Diagnóstico Especializado, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia
- <sup>4</sup> Servicio de Inmunología, Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona, España
- <sup>5</sup> Dirección Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** Los genes que codifican para el sistema de antígenos leucocitarios humanos (*Human Leukocyte Antigen*, HLA) son muy polimorfos y de gran importancia en procedimientos de trasplante de órganos, ya que la determinación de las frecuencias alélicas en poblaciones específicas se tiene en cuenta entre los criterios científicos para la asignación de órganos.

**Objetivo.** Establecer las frecuencias antigénicas y haplotípicas de HLA-A, -B y -DRB1 en donantes de órganos con muerte encefálica, representativos de la población colombiana.

**Materiales y métodos.** En este estudio descriptivo retrospectivo de 2.506 donantes cadavéricos de órganos, se hizo un análisis alélico y de haplotipos de HLA-A, -B y -DRB1, y se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg.

**Resultados.** Se encontraron 21, 43 y 15 grupos alélicos para los *loci* A\*, B\* y DRB1\*, respectivamente. Se detectaron 1.268 haplotipos HLA-A, -B y -DR, 409 haplotipos HLA A-B, 383 haplotipos HLA-B-DR y 218 haplotipos HLA-A-DR. Los tres *loci* se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg entre el número de heterocigóticos observados y el esperado, con valores de  $p < 0,05$ .

**Conclusiones.** En este estudio se proporciona información sobre la distribución de los alelos HLA de clase I y II en la población de donantes de órganos provenientes de las seis regionales en las que está dividido el país para la prestación de servicios de trasplante.

**Palabras clave:** antígenos HLA; alelos; haplotipos; trasplante; donantes de tejidos; Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3263>

### Determination of HLA-A, -B and -DRB1 polymorphism in brain dead organ donors representative of the Colombian general population, 2007-2014

**Introduction:** Genes encoding for human leukocyte antigens (HLA) are highly polymorphic and of great importance in organ transplantation procedures, as determining allelic frequencies in defined populations is taken into account among the scientific criteria for organ allocation.

**Objective:** The objective of this study was to establish the antigen HLA-A, -B, and -DRB1 haplotype frequencies in organ donors representative of the Colombian population after brain death.

**Materials and methods:** We conducted a descriptive retrospective study involving 2,506 cadaveric organ donors including an allelic and haplotype analysis of HLA-A, -B and -DRB1; we also determined the Hardy-Weinberg equilibrium.

**Results:** We identified 21, 43 and 15 allelic loci for groups A\*, B\* and DRB1\*, respectively. We detected 1,268 HLA-A, -B and -DR, 409 HLA-A-B, 383 HLA-DR-B, and 218 HLA-A-DR haplotypes. The three loci were found to be in Hardy-Weinberg equilibrium between the number of heterozygotes observed and the expected number, with p values of  $< 0.05$ .

#### Contribución de los autores:

Yazmín Arias-Murillo: consolidación y validación de información, análisis genético de los datos y discusión de los resultados

Karime Osorio-Arango: consolidación, validación y análisis epidemiológico de los datos

Brayan Bayona: análisis genético de los datos y discusión de los resultados

Guadalupe Ercilla: discusión de los resultados

Mauricio Beltrán-Durán: discusión de los resultados

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

**Conclusions:** This study provides information on the allelic distribution of HLA class I and II in organ donors from the six regions in which Colombia is structurally divided to provide transplant services.

**Key words:** HLA antigens; alleles; haplotypes; transplantation; tissue donor, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3263>

Los genes que codifican para el sistema de antígenos leucocitarios humanos (*Human Leukocyte Antigen*, HLA) son muy polimorfos y están asociados con un amplio número de funciones que van desde la presentación antigénica hasta la regulación de la reacción inmunitaria celular y humoral, por lo cual influyen de forma considerable en el reconocimiento alógeno en procedimientos de trasplante de órganos, en los cuales la compatibilidad del HLA tiene un papel fundamental (1-4).

Dada la importancia del HLA en los procedimientos de trasplante de órganos, la determinación de las frecuencias alélicas en poblaciones definidas debe tenerse en cuenta en el establecimiento de los criterios científicos para la asignación de órganos. En Colombia, esta se realiza bajo tres consideraciones generales: criterios regionales o geográficos, criterios bioéticos y criterios clínicos (5,6).

La Red de Donación y Trasplantes está organizada en dos niveles (Decreto 2493): el nivel nacional, en el cual se encuentra la Coordinación Nacional a cargo del Instituto Nacional de Salud, y un nivel regional constituido por seis coordinaciones a cargo de las direcciones departamentales y distritales de salud (5).

El objetivo de este estudio fue establecer las frecuencias alélicas y haplotípicas de HLA-A, -B y -DRB1 en donantes de órganos con muerte encefálica provenientes de las seis coordinaciones regionales de donación y trasplante del país.

### Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio descriptivo retrospectivo en donantes cadavéricos de órganos registrados en el sistema de la Red Nacional de Donación y Trasplantes del Instituto Nacional de Salud de Colombia, entre el 2007 y el 2014, que contaban con información del perfil HLA tipificado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de iniciadores específicos de secuencia

(*sequence-specific primers PCR*) y PCR con sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia (*sequence-specific oligonucleotide probes PCR*), y cuyos datos pudieron ser validados por los laboratorios de inmunogenética en las seis regionales de trasplantes que conforman la Red.

El análisis estadístico se realizó en dos etapas: en la primera, se describieron las variables mediante el cálculo de medidas de tendencia central y de dispersión para las variables cuantitativas, y el cálculo de frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas con el programa IBM SPSS Statistics 22®, y en la segunda, se hicieron los análisis alélico y de haplotipos de los HLA-A, -B, y -DRB1 de los donantes cadavéricos, así como la determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg, utilizando el programa de análisis genético Arlequín 3.1.

### Consideraciones éticas

En este estudio retrospectivo se utilizó información secundaria, pues se utilizaron los datos de donantes de órganos, registrados en el sistema de información de la Red Nacional de Donación y Trasplantes, cuyos familiares habían firmado un consentimiento informado según la normatividad vigente y cuyos órganos ya habían sido recolectados y procesados antes del estudio.

No se intervinieron ni se modificaron de forma intencionada las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos participantes y, por lo tanto, el estudio correspondió a 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 vigente para la Red Nacional de Donación y Trasplantes (5).

### Resultados

Se analizaron 2.506 donantes de órganos registrados entre el 2007 y el 2014, de los cuales la mayoría correspondía al 2009 (14,6 %) y al 2010 (14,6 %); 71,6 % eran hombres, y la mediana de edad fue de 33 años, con un mínimo de 2 y máximo de 69 años: 30 años en hombres y 44 en mujeres. El grupo sanguíneo mayoritario fue el O positivo (60,0 %). La regional donde se reportaron

Correspondencia:

Yazmín Arias-Murillo, Coordinación Red Nacional de Donación y Trasplantes, Dirección Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia  
Teléfono: (571) 220 0925  
[ariasmurillo@hotmail.com](mailto:ariasmurillo@hotmail.com)

Recibido: 01/03/16; aceptado: 21/07/16

más donantes fue Medellín (38,1 %), seguida de Bogotá (36,6 %). La principal causa de muerte fue el trauma craneoencefálico (66,7 %), sobre todo en los hombres, en tanto que en las mujeres lo fue el accidente cerebrovascular (cuadro 1).

### Frecuencias alélicas

Se detectaron 21 grupos alélicos para el *locus* A\*, 43 para el B\* y 15 para el DRB1\*. En el *locus* A\* las mayores frecuencias correspondieron a los alelos A\*02 (22,5 %), A\*24 (20,2 %), A\*03 (7,6 %), A\*68 (6,9 %) y A\*01 (6,6 %). Los alelos menos frecuentes en la población analizada fueron el A\*69 y el A\*80, con porcentajes por debajo de 0,1 %, mientras que los demás alelos presentaron frecuencias que fluctuaban entre 0,1 y 5,7 %.

Los alelos más frecuentes en el *locus* HLA-B\* fueron el B\*35 (20,9 %), el B\*44 (9,5 %), el B\*07 (6,4 %), el B\*51 (6,3 %) y el B\*39 (4,7 %); los

alelos menos frecuentes fueron el B\*67, el B\*73 y el B\*82, cada uno con una frecuencia de 0,02 %. En los demás alelos la frecuencia fluctuó entre 0,1 y 4,5 %.

En el *locus* HLA-DRB1\*, las mayores frecuencias correspondieron al DRB1\*04 (23,0 %), el DRB1\*13 (11,7 %), el DRB1\*07(11,0 %), el DRB1\*15 (9,8 %) y el DRB1\*01 (9,5 %). Los alelos DRB1\*12 y DR18 (3) presentaron frecuencias más bajas, con 1,1 y 0,9 %, respectivamente. Los otros alelos presentaron frecuencias entre 1,5 y 7,0 % (cuadro 2).

**Cuadro 2.** Porcentaje de los alelos HLA-A, -B y -DR en donantes de órganos en Colombia, 2007-2014

A	%	B	%	DR	%
02	22,50	35	20,91	04	23,02
24	20,15	44	9,50	13	11,75
03	7,65	07	6,39	07	10,97
68	6,89	51	6,27	15	9,82
01	6,55	39	4,72	01	9,54
30	5,73	18	4,48	08	7,03
11	5,24	61	4,36	11	6,91
29	4,88	40	3,09	14	5,10
23	4,42	08	3,05	16	4,44
31	3,72	15	2,95	17	4,16
33	3,46	38	2,91	10	2,03
26	3,42	65	2,87	09	1,69
32	2,15	14	2,55	03	1,51
25	0,96	49	2,55	12	1,12
74	0,82	58	2,17	18	0,92
34	0,72	27	1,95		
66	0,46	57	1,81		
36	0,20	53	1,67		
69	0,06	52	1,63		
80	0,02	50	1,57		
		62	1,53		
		41	1,43		
		45	1,35		
		48	1,31		
		13	1,08		
		60	1,00		
		37	0,74		
		64	0,74		
		55	0,68		
		72	0,60		
		42	0,58		
		63	0,54		
		81	0,20		
		56	0,16		
		71	0,16		
		78	0,16		
		47	0,10		
		46	0,08		
		54	0,08		
		70	0,04		
		67	0,02		
		73	0,02		
		82	0,02		

**Cuadro 1.** Características de los donantes de órganos en Colombia, 2007-2014

Variable	n	%
Sexo		
Masculino	1.794	71,6
Femenino	712	28,4
Año		
2004	262	10,5
2008	300	12,0
2009	366	14,6
2010	365	14,6
2011	360	14,4
2012	285	11,4
2013	243	9,7
2014	325	13,0
Regional		
Bogotá	918	36,6
Medellín	954	38,1
Cali	430	17,2
Bucaramanga	71	2,8
Barranquilla	32	1,3
Neiva	101	4,0
Grupo sanguíneo		
O+	1.504	60,0
A+	664	26,5
B+	172	6,9
O-	97	3,9
A-	43	1,7
AB+	24	1,0
B-	2	0,1
Causa de muerte		
Trauma craneoencefálico	1.466	66,7
Accidente cerebrovascular	566	25,8
Otra causa	73	3,3
Encefalopatía hipóxica	66	3,0
Tumor cerebral	26	1,2
Tumor extracerebral	1	0,0

**Frecuencias de haplotipos**

Se detectaron 1.268 haplotipos HLA-A, -B y -DR; se encontraron 409 haplotipos HLA-A y -B; 383 HLA-B y -DR y 218 HLA-A y -DR. De los 1.268 haplotipos HLA-A, -B y -DR encontrados, la mayoría correspondió al A\*24-B\*35-DR\*04, con 5,3 %, seguidos por el A\*29-B\*44-DR\*07 (1,7 %), el A\*24-B\*61-DR\*04 (1,6 %), el A\*24-B\*35-DR\*08 (1,5 %), el A\*02-B\*35-DR\*04 (1,4 %) y el A\*03-B\*07-DR\*15 (1,4 %) (figura 1).

Los haplotipos HLA-A y -B más frecuentes fueron el \*A\*24-B\*35, en 10 % de la población, seguido del A\*02-B\*51 (3,4 %), el A\*02-B\*35 (2,7 %) y el A\*29-B\*44, el A\*02-B\*39 y el A\*24-B 61(B\*40), cada uno con 2,5 % (figura 2).

De los 383 haplotipos HLA-B y -DR detectados, el que presentó mayor frecuencia en la población fue el B\*35-DR\*04 (9 %), seguido por el B\*44-DR\*07 (4,1 %), el B\*07-DR\*15 (3,4 %), el B\*35-DR\*08 (2,5 %) y el B\*35-DR\*01 (2,4 %) (figura 3).

De los 218 haplotipos HLA-A y -DR, el más frecuente fue el HLA A\*24-DR\*04, en 10 % de la población, seguido por el A\*02-DR\*04 (5,8 %), el A\*02-DR\*13 (3,5 %), el A\*02-DR\*07 (2,4 %), y por los haplotipos A\*02-DR\*08, A\*03-DR\*15, A\*03-DR\*15 y A\*24-DR\*08, cada uno con 2,2 % (figura 4).

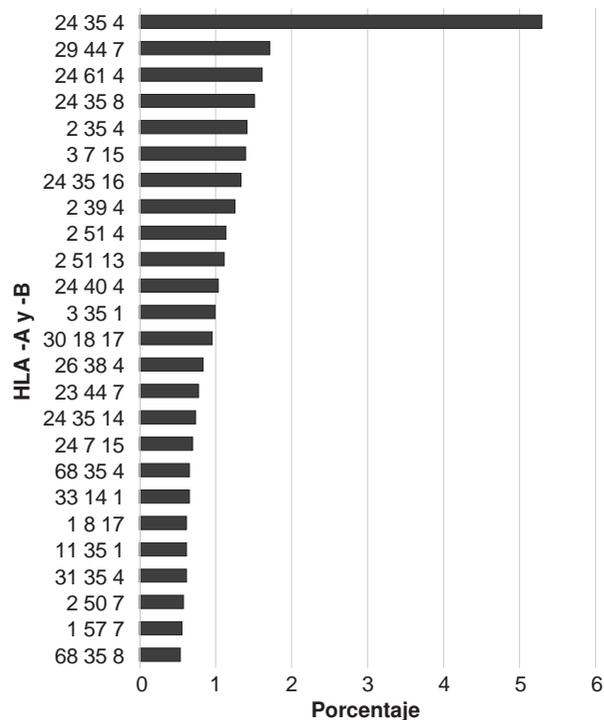


Figura 1. Frecuencia superior a 0,66 % de los haplotipos HLA-A, -B y -DR

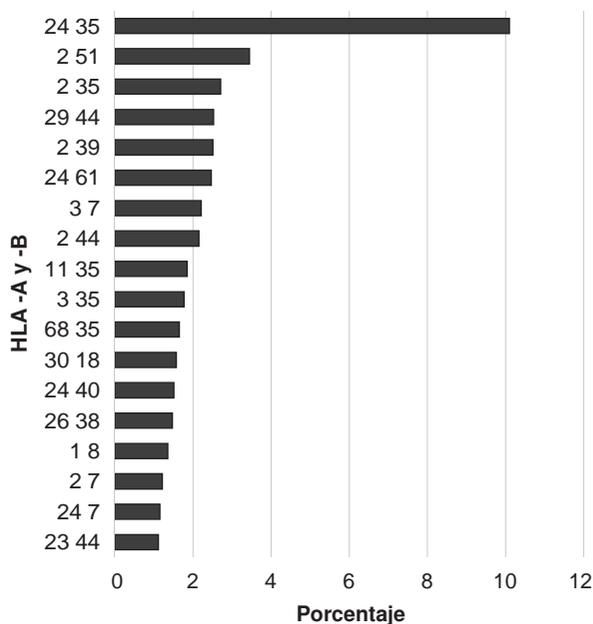


Figura 2. Frecuencia superior a 1,0 % de los haplotipos HLA-A y -B

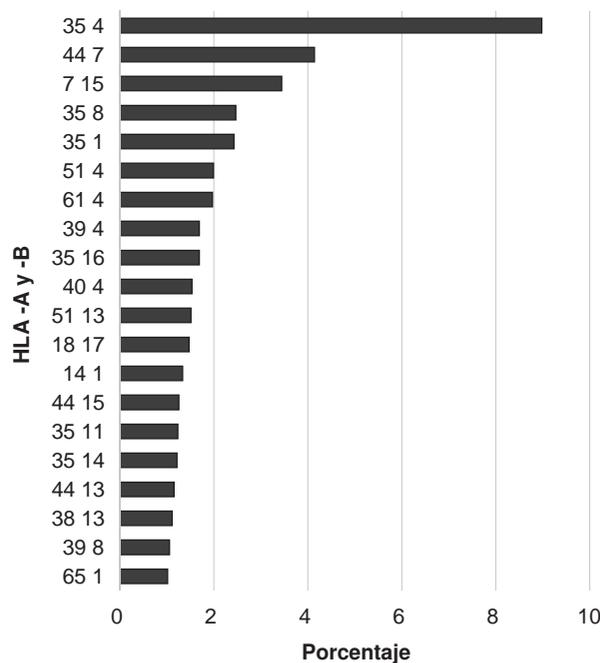


Figura 3. Frecuencia superior a 1,0 % de los haplotipos HLA-B y -DR

**Equilibrio de Hardy-Weinberg para cada locus**

Los tres loci se hallaron en equilibrio de Hardy-Weinberg con valores de  $p < 0,05$  para la relación entre el número de heterocigóticos observados y el de los esperados (cuadro 3).

### Discusión

En este estudio se registró información sobre la distribución de los alelos HLA de clases I y II en la población de donantes de órganos provenientes de las seis regionales en las que está dividida estructuralmente Colombia para el funcionamiento de la Red de Donación y Trasplantes (5,6).

La Red funciona mediante la coordinación regional, con sedes administrativas en Bogotá, Medellín, Cali, Bucaramanga, Barranquilla y Neiva, y las siguientes áreas de influencia: Regional 1: Cundinamarca, Tolima, Boyacá, Casanare, Meta, Caquetá, Vichada, Vaupés, Guaviare, Guainía, Putumayo y Amazonas; Regional 2: Antioquia, San Andrés y

Providencia, Chocó, Córdoba y Caldas; Regional 3: Valle, Risaralda, Quindío, Cauca y Nariño; Regional 4: Santander, Norte de Santander, Cesar y Arauca; Regional 5: Atlántico, Bolívar, Magdalena, La Guajira y Sucre, y Regional 6: Huila.

Los donantes reportados por cada regional pueden proceder de cualquier municipio de su jurisdicción. Esto influye directamente sobre la asignación de órganos con fines de trasplante, ya que los criterios de dicha distribución obedecen, en primer lugar, a criterios geográficos, motivo por el cual es importante conocer las frecuencias de HLA por regionales.

Los criterios científicos y técnicos para la asignación, por ejemplo, de un riñón, incluyen el tener un grupo sanguíneo idéntico o compatible en casos especiales; la compatibilidad de los HLA-A, -B y -DR; la demanda metabólica determinada por la edad; la sensibilización de los pacientes; el antecedente de haber sido donante vivo, y los días en lista de espera. Entre estos criterios, la compatibilidad del HLA otorga el segundo puntaje más alto después de la identidad del grupo sanguíneo, por lo cual es un factor determinante en la asignación de órganos.

Las características generales de la población estudiada, la distribución por edad, el grupo sanguíneo y las causas de muerte son datos que se reportan rutinariamente en los informes de la Red de Donación y Trasplantes de Colombia (7-10).

Los alelos más frecuentes fueron el A\*02 (22,5 %) y el A\*24 (20,2 %), lo cual coincide con los datos reportados en otros estudios en Colombia, en Latinoamérica y en la población hispana en general, los cuales evidencian que estos dos alelos aparecen con una frecuencia superior al 40 % (11-25).

Tal como ha sucedido en estudios anteriores en la población colombiana (10,21), no se detectó el alelo A\*43, el cual solo se ha encontrado, con poca frecuencia, en un estudio en la población de Medellín (11). El alelo menos frecuente fue el A\*80 (0,02 %), información ya registrada en otros estudios de varias poblaciones en Colombia (11,14,25).

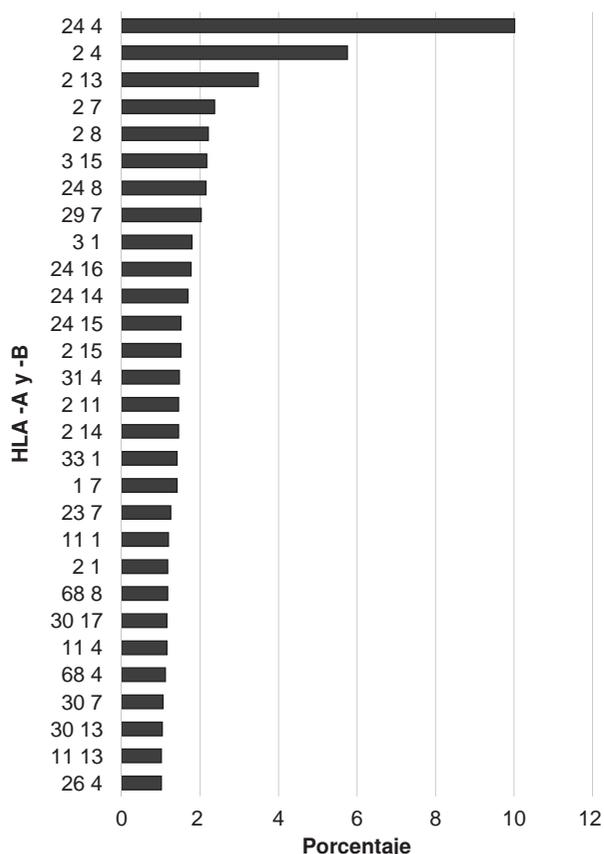


Figura 4. Frecuencia superior a 1,0 % de los haplotipos HLA-A y -DR

Cuadro 3. Equilibrio de Hardy-Weinberg para cada locus

Locus HLA	Número de genotipos	Heterocigotos observados	Heterocigotos esperados	p	Desviación estándar
A*	2.511	0,88132	0,87928	0,00938	0,00007
B*	2.511	0,92314	0,92432	0,00000	0,00000
DRB1*	2.511	0,88252	0,88546	0,00000	0,00000

En el *locus* B fue posible detectar 43 alelos, de los cuales el 40 % se presentó con frecuencias inferiores a 1 %. Solo el B\*35 tuvo una frecuencia superior a 20 %, es decir, fue el más representativo, tal como se ha registrado para la población colombiana y latinoamericana en otros estudios (11-19).

El *locus* B es el más polimorfo, y en él se detectó un número mayor de alelos, de los cuales los B\*35, B\*44, B\*07, B\*51, B\*39, B\*18, B\*61, B\*40 y B\*08, tuvieron frecuencias por encima del 3 % en la población estudiada y representaron el 63 % de la variación determinada en este *locus*.

Se detectaron, en esta ocasión, los alelos B\*54, B\*67, B\*73 y B\*82, los cuales no se habían encontrado anteriormente en población colombiana. Los alelos del *locus* B\* con menor representación en la población analizada fueron el B\*70, el B\*67, el B\*73 y el B\*82, con frecuencias por debajo de 0,1 %. Se evidenciaron diferencias con lo reportado en estudios anteriores en población colombiana en cuanto a los alelos B\*14, B\*15 y las variantes alélicas ya claramente detectadas, variaciones determinadas, ante todo, por la disparidad en la resolución de las técnicas utilizadas para la tipificación del HLA.

Dado que el presente estudio fue retrospectivo y utilizó información suministrada por los laboratorios de inmunología de los hospitales y las clínicas habilitadas para la prestación de servicios de trasplante entre 2007 y 2014, y dado que no todos los laboratorios migraron en el mismo año a la tecnología Luminex, es dable suponer que en los años 2010 y 2011 no se detectaban todas las variantes alélicas de HLA-B\*14, HLA-B\*15, y DRB1\*03 (11,12,14,25).

En cuanto al *locus* DRB1\*, las frecuencias más altas fueron para los alelos DRB1\* 04, DRB1\* 13, DRB1\* 07, DRB1\* 15 y DRB1\* 01, con valores por encima de 9,5 %, los cuales, en su conjunto, representaron el 65 % de la variación para este *locus*, resultados que concuerdan con reportes anteriores en población colombiana (11,14,25).

El DRB1\*04 fue el alelo más frecuente (23 %), resultado similar a lo reportado por Ossa, *et al.*, Arias, *et al.* y Arrunátegui, *et al.* (12,14,25); la frecuencia de este alelo es diferencialmente alta comparada con la de los demás alelos del *locus* DRB1\*, pues duplica la del que ocupa el segundo lugar, el DRB1\*13 (11,7 %).

Los alelos que presentaron las frecuencias más bajas fueron el DRB1\*12 y el DR 18(3), lo cual coincide con lo reportado en estudios anteriores

en población colombiana (11). Sin embargo, es necesario mencionar que, al igual que las posibles deficiencias en la tipificación de las variantes alélicas B\*14 y B\*15, es posible que las relacionadas únicamente con la resolución de la técnica hayan resultado en un menor registro de la frecuencia del DR18 (3), la cual podría haberse subsumido en las tipificaciones reportadas como DRB1\*03. Para determinar frecuencias más exactas en este tipo de alelos, sería necesario evaluar una muestra de individuos con la misma técnica para homologar, así, la resolución utilizada.

El haplotipo HLA A\*24 B\*35 DRB1\*04 fue el más frecuente, con 5,3 %, lo cual concuerda con lo reportado en estudios anteriores (11,14,25); sin embargo, dado que en este estudio la población provenía de diferentes regiones de Colombia, se pudieron observar algunas diferencias con estudios anteriores en poblaciones específicas, como las del suroccidente colombiano, y las de Medellín y Bogotá.

En este estudio se proporciona información sobre la distribución de los antígenos HLA de clases I y II en la población de donantes de órganos provenientes de las seis regionales en las que está dividida la Red de Donación y Trasplantes, resultados que permitirán a los grupos de trasplante del país tener una base para calcular la probabilidad de encontrar donantes compatibles con los pacientes registrados en las listas de espera, así como con aquellos pacientes en espera de trasplante renal y cardíaco que por sus condiciones clínicas estén sensibilizados con anticuerpos contra HLA, pues los resultados presentados permiten utilizar el panel de anticuerpos reactivos con las frecuencias antigénicas y de haplotipos de HLA de la población colombiana.

Con la información de la Red de Donación y Trasplante sobre donantes de las seis regionales del país, será posible determinar si existen diferencias significativas en la frecuencia de alelos y haplotipos por región geográfica.

### Agradecimientos

Al Instituto Nacional de Salud, especialmente a la Dirección de Redes en Salud Pública, a la Subdirección Red Nacional de Trasplantes y Bancos de Sangre, a la Coordinación Red Nacional de Donación y Trasplantes, y a la Oficina de Tecnología de la Información y Comunicación, así como a los laboratorios de inmunología que actúan como parte de la Red de Donación y Trasplantes en el país.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

### Financiación

Dirección Redes en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud

### Referencias

- Doxiadis II.** Compatibility and kidney transplantation: The way to go. *Front Immunol.* 2012;14:3:111. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00111>
- Clark B, Unsworth DJ.** HLA and kidney transplantation. *J Clin Pathol.* 2010;63:21-5. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2009.072785>
- Aydingoz SE, Takemoto SK, Pinsky BW, Salvalaggio PR, Lentine KL, Willoughby L, et al.** The impact of human leukocyte antigen matching on transplant complications and immunosuppression dosage. *Hum Immunol.* 2007;68:491-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2007.02.004>
- Laperrousaz S, Tiercy J, Villard J, Ferrari S.** HLA and non-HLA polymorphisms in renal transplantation. *Swiss Med Wkly.* 2012;142:368-79. <http://dx.doi.org/10.4414/sm.2012.13668>
- Ministerio de Salud y Protección Social.** Decreto 2493. Diario Oficial N°. 45631. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia; 2004.
- Ministerio de Salud y Protección Social.** Resolución 2640. Diario Oficial N° 46007. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia; 2005.
- Instituto Nacional de Salud.** Informe Red Donación y Trasplante, 2010. Bogotá: INS; 2010. Fecha de consulta: 10 de junio de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadsticas/Informe%20FinalRed%20D%20Tx%20-%202010.pdf>.
- Instituto Nacional de Salud.** Informe anual Red de Donación y Trasplantes, 2011. Bogotá: INS; 2011. Fecha de consulta: 10 de junio de 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadsticas/Informe%20Red%20Donacion%20y%20Trasplantes%20Vol%201%202011.pdf>.
- Instituto Nacional de Salud.** Informe anual Red de Donación y Trasplantes, 2012. Bogotá: INS; 2012. Fecha de consulta: 10 de junio de 2015. Disponible en: [http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadsticas/Informe\\_Red%20donacion%20y%20trasplantes%20Vol2\\_2012.pdf](http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadsticas/Informe_Red%20donacion%20y%20trasplantes%20Vol2_2012.pdf).
- Instituto Nacional de Salud.** Informe anual Red de Donación y Trasplantes, 2013. Bogotá: INS; 2013. Fecha de consulta: 10 junio 2015. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadsticas/INFORME%20ANUAL%202013%20RED%20DE%20DONACION%20Y%20TRASPLANTES.%20Vol%2003.pdf>.
- Rodríguez LM, Giraldo MC, García N, Velásquez L, París SC, Álvarez CM, et al.** Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 en donantes fallecidos, Medellín, Colombia. *Biomédica.* 2007;27:537-47. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v27i4.172>
- Ossa H, Manrique A, Quintanilla S, Peña A.** Polimorfismos del sistema HLA (loci A\*, B\* y DRB1\*) en población colombiana. *NOVA.* 2007;5:25-30.
- Bermeo S, Guerra M, Ostos H.** Frecuencias de HLA-A-B y DRB1 en una población de Huila, Colombia. *Revista Facultad de Salud.* 2010;2:9-19.
- Arias Y, Castro M, Ríos M, López J, Echeverry S, Martínez O, et al.** Analysis of HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 allelic, genotypic, and haplotypic frequencies in Colombian population. *Colombia Médica.* 2010;41:336-43.
- Bengochea M, Álvarez I, Hidalgo PC, Cabrera A, Senatore O, Toledo R, et al.** HLA-A, -B, -DR en receptores de trasplante de médula ósea en Uruguay. *Rev Med Uruguay.* 2003;19:149-58.
- Alfaro EL, Dipierri JE, Gutiérrez N, Vullo CM.** Frecuencias génicas y haplotípicas del sistema HLA en el noroeste argentino. *Antropo.* 2004;6:15-23.
- Weir BS.** Genetic Data Analysis II. Sunderland, MA: Sinauer Associates; 1996.
- de Pablo R, Beraún Y, Nieto A, Calzada JE, Rementería MC, Sanz L, et al.** HLA class I and class II allele distribution in the Peruvian population. *Tissue Antigens.* 2000;56:507-14. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-0039.2000.560604.x>
- Cao K, Hollenbach J, Shi X, Shi W, Chopek M, Fernández-Viña MA.** Analysis of the frequencies of HLA-A, B and C alleles and haplotypes in the five mayor ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations. *Hum Immunol.* 2000;62:1009-30. [http://dx.doi.org/10.1016/S0198-8859\(01\)00298-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0198-8859(01)00298-1)
- Cao K, Hollenbach JA, Shi XJ, Shi WX, Chopek M, Fernández-Viña MA.** HLA-A,-B and Cw allele frequencies in Hispanic population from the USA. *Hum Immunol.* 2004;65:1206-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2004.08.160>
- Cao k, Hollenbach J, Shi X, Shi W, Chopek M, Fernández-Viña MA.** Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations. *Hum Immunol.* 2001;62:1009-30. [http://dx.doi.org/10.1016/S0198-8859\(01\)00298-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0198-8859(01)00298-1)
- Mori M, Beatty PG, Graves M, Boucher KM, Milford EL.** HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: The National Marrow Donor Program Donor Registry 1. *Transplantation.* 1997;64:1017-27.
- Middleton D, Williams F, Meenagh A, Daar AS, Gorodezky C, Hammond M, et al.** Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. *Hum Immunol.* 2000;61:1048-52. [http://dx.doi.org/10.1016/S0198-8859\(00\)00178-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0198-8859(00)00178-6)
- Zachary AA, Steinberg AG, Bias WB, Leffell MS.** The frequencies of HLA alleles and haplotypes and their distribution among donors and renal patients in the UNOS registry. *Transplantation.* 1996;62:272-83.
- Arrunátegui A, Villegas A, Ocampo L, Rodríguez L, Abdelmounim B.** Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas del sistema HLA clase I y II en donantes de una población del suroccidente colombiano. *Acta Med Colomb.* 2013;38:16-21.

ARTÍCULO ORIGINAL

## Frecuencia de mutaciones de la nitrorreductasa RdxA de *Helicobacter pylori* para la activación del metronidazol en una población del departamento del Cauca, Colombia

Claudia Patricia Acosta<sup>1,2</sup>, Andrés Javier Quiroga<sup>1,2</sup>, Carlos H. Sierra-Torres<sup>1,2</sup>, Alba Alicia Trespalacios<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Genética Humana Aplicada, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

<sup>2</sup> Fundación InnovaGen, Popayán, Colombia

<sup>3</sup> Grupo de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** La resistencia al metronidazol es un factor clave relacionado con el fracaso del tratamiento contra la infección por *Helicobacter pylori* asociada, principalmente, con mutaciones en la nitrorreductasa RdxA. A pesar de su importancia, los estudios sobre esta proteína son aún incipientes en Popayán, Colombia.

**Objetivo.** Evaluar la frecuencia de las mutaciones en la nitrorreductasa RdxA en una población de pacientes con enfermedad gastrointestinal por *H. pylori*.

**Materiales y métodos.** El ADN de 170 biopsias gástricas se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar las mutaciones en la nitrorreductasa RdxA. Se analizaron las secuencias traducidas a aminoácidos y se compararon con la cepa de referencia 26695.

**Resultados.** La frecuencia de mutaciones de la nitrorreductasa RdxA en la población de estudio fue de 78 %. Su distribución más frecuente se detectó en las posiciones D59N (en 153 muestras), R131K (en 101 muestras), R90K (en 97 muestras), A118T (en 42 muestras), I160F (en 32 muestras), H97T (en 26 muestras) y en los codones de parada Q50\*, D59\*, E75\*, C159\* y I160\* en cinco, una, tres, diez y seis muestras, respectivamente. El genotipo de virulencia más frecuente fue el *vacAs1/m1* negativo para *cagA* (48,6 %).

**Conclusiones.** La gran frecuencia de mutaciones en la nitrorreductasa RdxA en aislamientos de *H. pylori* en Popayán sugiere que los tratamientos empíricos con metronidazol no serían una opción válida para su erradicación en pacientes de la población estudiada.

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori*; mutación; nitrorreductasas; metronidazol; Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3007>

### Frequency of *Helicobacter pylori* nitroreductase RdxA mutations for metronidazole activation in a population in the Cauca Department, Colombia

**Introduction:** Resistance to metronidazole is a key factor associated with *Helicobacter pylori* treatment failure. Even though resistance is mostly associated with RdxA nitroreductase mutations, studies of this *H. pylori* protein in Popayán (Colombia) are still incipient.

**Objective:** To evaluate the frequency of mutations in the RdxA nitroreductase in a population of patients with *H. pylori*-positive gastrointestinal disease.

**Materials and methods:** We amplified the DNA of 170 gastric biopsies by PCR to detect mutations in the RdxA nitroreductase. An analysis of DNA sequences translated into amino acid sequences was done and then compared to the reference strain 26695.

**Results:** The frequency of RdxA nitroreductase mutations in this study population was 78%. Its most frequent distribution was found in positions D59N (153 samples), R131K (101 samples), R90K (97 samples), A118T (42 samples), I160F (32 samples) and H97T (26 samples), and meaningful stop codons Q50\*, D59\*, E75\*, C159\* and I160\* in five, one, three, ten and six samples, respectively. The most common virulence genotype was *vacAs1/m1 cagA* negative (48.6 %).

#### Contribución de los autores:

Claudia Patricia Acosta: coordinación general de actividades, supervisión metodológica y análisis de secuencias

Andrés Javier Quiroga: ejecución de pruebas moleculares y análisis de secuencias

Carlos H. Sierra-Torres: análisis de resultados

Alba Alicia Trespalacios: análisis de resultados y análisis de secuencias

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

**Conclusions:** The high frequency of RdxA nitroreductase mutations in *H. pylori* isolates in Popayán (Colombia) indicates that empirical therapy with metronidazole may not be a valid option for the eradication of *H. pylori* in patients of the studied population.

**Key words:** *Helicobacter pylori*; mutations; nitroreductases; metronidazole; Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3007>

Las nitrorreductasas son un grupo de enzimas que catalizan la reducción de grupos nitro de compuestos estructuralmente diversos que incluyen los nitrotoluenos, los nitrofuranos y los nitroimidazoles. Estas enzimas se pueden subdividir en dos clases generales: sensibles al oxígeno e insensibles al oxígeno (1).

En *Helicobacter pylori*, bacteria que infecta a los seres humanos y se asocia con el desarrollo de gastritis, úlcera péptica, linfoma gástrico de tejido linfoide asociado a mucosa (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*, MALT) y cáncer gástrico (2,3), la nitrorreductasa RdxA insensible al oxígeno cataliza la reducción del medicamento antimicrobiano metronidazol y genera productos intermedios y finales, como la hidroxilamina y el peróxido de hidrógeno, y radicales libres de oxígeno que producen daño en el ADN y la muerte celular del microorganismo (1).

Esta nitrorreductasa es esencial para la activación del metronidazol en *H. pylori* (4), el cual se considera un antimicrobiano efectivo contra organismos con poca reacción de oxidorreducción (*redox*) intracelular, como las bacterias anaerobias, los protozoos y los microorganismos microaerófilos, entre ellos, *H. pylori* (5).

Uno de los medicamentos utilizados en los esquemas de tratamiento para la erradicación de esta infección es el metronidazol; sin embargo, la aparición de aislamientos que no responden al medicamento ha fomentado el interés en las investigaciones para comprender las causas principales de la resistencia de la bacteria a su acción (4-6).

En varias revisiones sistemáticas se ha reportado una gran heterogeneidad en las frecuencias de prevalencia de la resistencia primaria al metronidazol en los países latinoamericanos, y cabe resaltar que Colombia presenta la tasa de resistencia más alta, 83 % (7,8).

Correspondencia:

Claudia P. Acosta, Laboratorio de Genética Humana, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, Calle 5 N° 4-70, Popayán, Colombia

Teléfono y fax: (572) 820 9872

[cpacosta@unicauca.edu.co](mailto:cpacosta@unicauca.edu.co)

Recibido: 06/08/15; aceptado: 04/08/16

Los resultados de diversos estudios han demostrado que la resistencia de *H. pylori* al metronidazol se debe a la presencia de diferentes mutaciones en el gen *rdxA*, las cuales se evidencian como inserciones o deleciones en diferentes sitios del gen. Estos cambios en la secuencia del genoma llevan a que la nitrorreductasa RdxA codificada por el gen se inactiven y no logren reducir el metronidazol a nivel celular, generando así la resistencia de la bacteria al antimicrobiano (4,9,10). Las mutaciones que inactivan el gen *rdxA* originan codones de parada o sustituciones que tornan disfuncional la proteína. En algunos casos, el gen *frxA* promueve la aparición de resistencia y en otros muta con el gen *rdxA* (9,11).

La participación del gen *rdxA* en el desarrollo de la resistencia al metronidazol se ha estudiado mediante modelos en ratones para determinar su secuencia en cepas sensibles y resistentes al medicamento. Se ha encontrado que las cepas resistentes presentan mutaciones por el cambio en el marco de lectura resultado de la pérdida o ganancia de adenina (A) o de timina (T), mutaciones de sentido erróneo que contienen la sustitución de aminoácidos como la prolina (P) por la leucina (L), la tirosina (Y) por la histidina (H) y la alanina (A) por la valina (V) (12,13). Aldana, *et al.* (9), utilizaron muestras de pacientes sometidos a endoscopia, cultivadas y posteriormente inducidas a resistencia al someterlas a diversas concentraciones de metronidazol. En los análisis de la secuencia del gen *rdxA*, se han encontrado sustituciones de aminoácidos, como el cambio de serina (S) por asparagina (N).

Según las recomendaciones del Consenso de Maastricht IV (14,15), la secuenciación es una técnica utilizada con éxito en la determinación de mutaciones, en especial en áreas geográficas donde los cultivos de la bacteria no están disponibles. El uso de los tratamientos de erradicación de la infección debe basarse en estudios de prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos en cada región (2,7).

Puesto que en Colombia son pocos los estudios en que se ha determinado la presencia de mutaciones en la nitrorreductasa RdxA, dado que en el

departamento del Cauca no existe un laboratorio con la infraestructura para cultivar *H. pylori*, el objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de mutaciones de RdxA y describir los cambios que, según los reportado en varios estudios, estarían asociados con la resistencia al metronidazol.

## Materiales y métodos

### Población de estudio

Se incluyeron 170 pacientes remitidos a las unidades de gastroenterología del Hospital Universitario San José y el Susana López de Valencia, y a la Unidad ENDOVIDEO 2000 (29, 40 y 101, respectivamente) de Popayán, entre octubre de 2011 y junio de 2013.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: pacientes mayores de 18 años, nacidos en el departamento del Cauca, con síntomas de dispepsia, y que no hubieran recibido tratamiento de erradicación de *H. pylori*, ni antibióticos ni sales de bismuto durante el último año.

Los pacientes aceptaron su participación en el estudio mediante la firma de un consentimiento informado, según lo dispuesto en la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud. Esta investigación fue aprobada por los comités de ética de la Universidad del Cauca y de la Pontificia Universidad Javeriana. Los participantes respondieron un cuestionario estandarizado sobre algunas variables sociodemográficas y clínicas.

Se tomaron ocho biopsias de cada paciente: tres del antro, tres del cuerpo y dos de la incisura angular, según los criterios de Sydney (16). Para el análisis histopatológico, se utilizaron dos biopsias de antro y cuerpo, y una de incisura, todas examinadas por un único patólogo experto, siguiendo los criterios establecidos internacionalmente (17). Las biopsias restantes se utilizaron para la extracción del ADN.

### Extracción del ADN y amplificación mediante PCR

Las muestras de las biopsias gástricas (antro, incisura y cuerpo) de cada paciente se colocaron en recipientes independientes y se transportaron en medio de cultivo de caldo de *Brucella* spp. con 20% de glicerol para la extracción genómica, usando el estuche Wizard Genomic DNA Purification® (Promega, Madison, WI, USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ADN se reconstituyó en 100 µl de solución de rehidratación y se almacenó a -30 °C hasta su uso.

La calidad del ADN se determinó estableciendo la relación de absorbancia A260/A280 con un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000™.

La presencia de *H. pylori* se determinó por los alelos s y m del gen *vacA*, según la metodología descrita previamente (18). Se utilizó una prueba de PCR múltiplex (Qiagen Multiplex PCR®) para amplificar los genes *vacA* y *cagA*, con las siguientes secuencias de cebadores: *vacA* s F 5' – ATGGAAATACAACAAACACAC – 3'; R 5' – CTGCTTGAATGCGCCAAAC – 3'; *vacA* m F 5' – CAA TCT GTC CAA TCA AGC GAG – 3'; R 5' – GCG TCT AAA TAA TTC CAA GG – 3' y *cagA* F5'-GTTGATAACGCTGTGCTTC-3', R 5'-GGGTTGTATGATATTTCCATAA'3'. La reacción incluyó una mezcla de 2 µl de ADN genómico bacteriano, 1X de Qiagen Master Mix®, 0,3 pmol/µl de cada cebador, y 2 µl de agua libre de ARNasa en un volumen de 12 µl de reacción.

Los productos de amplificación se evidenciaron en geles de agarosa al 1,5 % por tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta, tomando como referencia las bandas de amplificación de las cepas NCTC 11637 (genotipo: *cagA*, *vacA* s1/m1) y 3062 (genotipo: *cagA* negativo, *vacA* s2/m2) de *H. pylori*.

### Análisis del gen *rdxA*

Se amplificó una región de 460 pb del gen *rdxA* en las muestras positivas para *H. pylori* determinadas por histopatología y mediante la genotipificación del gen *vacA*. Se usaron los iniciadores *rdxA* F 5'-GACAATTATTAACGAGCGC-3' y *rdxA* R 5'-CCTCCAATAATGCAACTATC-3' correspondientes a las posiciones 1013697 a 1014157 de la cepa de referencia 26695 (acceso en Genbank: gb|CP003904.1) (19), reportados por Kwon, *et al.* (20).

Para la PCR, se usó una mezcla con 2,7 U de Taq ADN polimerasa recombinante (Invitrogen™, Brasil), 5 µl de ADN genómico bacteriano, 0,5 pmol/µl de cada cebador, 1,0X de solución tampón de reacción proporcionada por el fabricante (Invitrogen™, Brasil), 2 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, y 0,5 mmol/L de cada deoxinucleótido trifosfato (dNTP) (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) en un volumen final de 50 µl de reacción.

Las muestras fueron llevadas al termociclador (MyCycler Thermal Cycler™, BIORAD) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial durante 9 minutos a 95 °C, 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación

a 50 °C durante 45 segundos, extensión a 72 °C durante 45 segundos, y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

Los productos de amplificación de 460 pb se evidenciaron en geles de agarosa al 2 % por tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta y por comparación con la banda de amplificación de la cepa de *H. pylori* NCTC 11638.

Los productos de la PCR se enviaron a Macrogen® Inc. Company (Corea) para el análisis de secuenciación del gen *rdxA*. Posteriormente, las secuencias obtenidas se evaluaron usando la herramienta BLASTx (*Basic Local Alignment Search Tool*) (21). Para determinar los cambios de la nitrorreductasa RdxA, se comparó con la región amplificada de la cepa de referencia 26695 (Genbank HP26695) (22) sensible al metronidazol según estudios previos (23). Además, se compararon con las secuencias de las cepas 11638 (identificación de la secuencia: emb|CAC83809.1| y gi|9858509|gb|AF180408.1|). Los cambios reportados fueron relacionados luego con los codones de parada y las mutaciones de cambio de aminoácidos. Se utilizó el programa CLUSTAL W (24) para el análisis de los cambios más significativos en la nitrorreductasa RdxA.

### Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS®, versión 19.0 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA), y se hizo la prueba de ji al cuadrado, con un valor de significación estadística de  $p < 0,05$ .

## Resultados

### Características sociodemográficas de la población

Se incluyeron 170 pacientes diagnosticados por histopatología con infección por *H. pylori*, y muestras sometidas a genotipificación y análisis del gen *rdxA*. La distribución de las características de sexo, edad, procedencia y escolaridad de los participantes se muestra en el cuadro 1. La edad de la población de estudio fluctuaba entre los 18 y los 84 años, y la edad promedio fue de  $51 \pm 13,6$  años; la mayoría eran mujeres (103, 60,6 %). El 51 % de la población provenía del área rural y el 62 % tenía un nivel educativo menor o igual a primaria.

Se hizo la genotipificación de todas las muestras y el genotipo más frecuente en esta población fue el *vacA* s1/m1 negativo para *cagA* (49,4 %), seguido por el genotipo *vacA* s1/m1 positivo para *cagA* (39,7 %), otros genotipos s2/m2 negativos para

*cagA* (5,3 %), el s1/m2 negativo para *cagA* (1,8 %), y el s1/m2 positivo para *cagA* (0,6 %); en 3,2 % de los pacientes se detectaron infecciones múltiples.

### Análisis de secuencia de la proteína RdxA

En 92,9 % de las secuencias de la proteína RdxA se detectaron cambios en, al menos, un aminoácido en comparación con la cepa de referencia 26695. En el cuadro 2 se presentan todas las mutaciones distribuidas en codones de parada y mutaciones puntuales desde la posición 46 hasta la posición 160 de la proteína RdxA. Por otra parte, el 78,2 % de las muestras presentó mutaciones relacionadas con la resistencia a metronidazol (49,10,13,22, 25), específicamente mutaciones puntuales tales como R131K (en 101 muestras), R90K (en 97 muestras), en A118T (en 42 muestras), H97T (en 26 muestras), E133K (en 11 muestras), y S108A (en 9 muestras), en tanto que el 21,8 % de las mutaciones puntuales no habían sido reportadas en aislamientos resistentes: la D59N (en 153 muestras), la G98S (en 27 muestras), la H97Y (en 18 muestras), la A118S (en 5 muestras) y la I160F (en 32 muestras) (4,6,12,22,26). Se encontraron, además, mutaciones relacionadas con los siguientes codones de parada: Q50\* (en cinco muestras); I160\* en seis muestras, E75\* en tres, C159\* en diez, y en la posición I62\* en dos muestras.

En la figura 1 se observan los tres sitios con mayor variabilidad en la proteína RdxA (R90, H97, R131), así como los codones de terminación en las posiciones 50, 78 y 102. En la posición 133, se encontró una doble sustitución asociada a un cambio en el marco de lectura. En el cuadro 3 se relacionan las mutaciones de inserción en las

**Cuadro 1.** Características sociodemográficas de la población estudiada

Característica	n (%)
Sexo	
Masculino	67 (39)
Femenino	103 (61)
Edad (años)	
18 a 40	35 (20)
41 a 60	93 (55)
61 a >71	42 (25)
Procedencia	
Urbana	84 (49)
Rural	86 (51)
Nivel de educación	
Primaria	105 (62)
Secundaria	39 (23)
Técnico	10 (6)
Superior	16 (9)

**Cuadro 2.** Frecuencia de mutaciones de aminoácidos en la nitrorreductasa RdxA de *Helicobacter pylori*

Tipo de mutación	Cambios en RdxA	n	(%)
Codón de terminación	Y47*	1	2,9
	D59*	1	2,9
	Q65 *	1	2,9
	E74 *	1	2,9
	K78*	1	2,9
	N103*	1	2,9
	E107*	1	2,9
	R112*	1	2,9
	V144*	1	2,9
	I62*	2	5,7
	E75*	3	8,5
	Q50*	5	14,2
	I160*	6	17,1
	C159*	10	28,5
	Total	35	100
		n 170 <sup>a</sup>	
Mutaciones puntuales	S46R	1	0,6
	C87Y	1	0,6
	E133Q	1	0,6
	T31E	2	1,2
	C87R	2	1,2
	K64S	2	1,2
	M149H	4	2,3
	I160K	4	2,3
	H53R	4	2,3
	K64N	5	2,9
	A118S	5	2,9
	A68V	6	3,5
	S108A <sup>b</sup>	9	5,3
	E133K <sup>b</sup>	11	6,5
	C159S	11	6,5
	M56I	14	8,2
	I160L	18	10,6
	H97Y	18	10,6
	H97T <sup>b</sup>	26	15,3
	G98S	27	15,9
I160F	32	18,8	
A118T <sup>b</sup>	42	24,7	
R90K <sup>b</sup>	97	57,1	
R131K <sup>b</sup>	101	59,4	
D59N	153	90,0	

<sup>a</sup>: número de muestras analizadas para mutaciones puntuales en RdxA

<sup>b</sup>: cambios asociados a resistencia según los estudios consultados (8,10)

\*: codón de terminación en la proteína RdxA

posiciones Q50\*, D59\* y E74\*, y de sustitución en las posiciones E75\*, K78\*, N103\* y C159\*, las cuales generaron codones de terminación y posibles interrupciones del marco abierto de lectura.

Por otro lado, se compararon los tipos de mutaciones distribuidos en las lesiones gástricas (cuadro 4) en las que fueron más frecuentes las mutaciones puntuales en las diferentes enfermedades gástricas, aunque no se registraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,74$ ) en comparación con las mutaciones en los codones de parada.

## Discusión

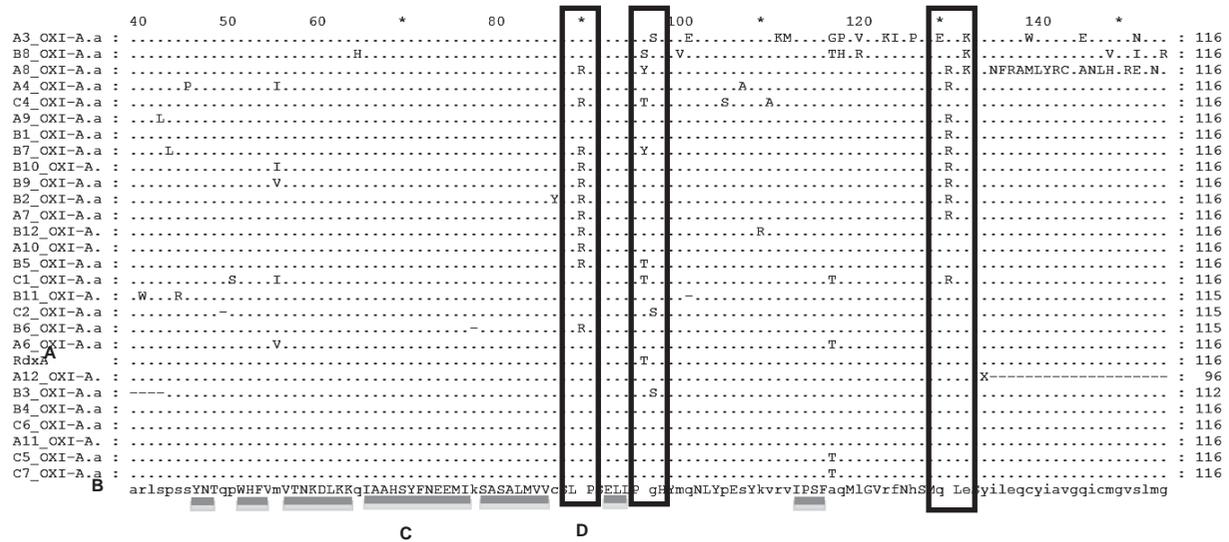
La resistencia de *H. pylori* al metronidazol se ha atribuido a la inhibición de la actividad de las nitrorreductasas, especialmente por mutaciones en el gen *rdxA*, las cuales se relacionan con la estabilidad de la proteína, en tanto que la dimerización y la actividad enzimática dependen de la unión al cofactor fosfato de lactoflavina (FMN) (1,5). Las mutaciones que afectan las posiciones A68V, A118T, R90K, R131K, R16H, S88P y H97T, y las que introducen un codón de parada, como N73\* y Q50\*, se han correlacionado con la resistencia al metronidazol, especialmente cuando hay valores altos en las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) (13,20,27) y cuando la CIM por dilución en agar es igual o superior a 12 µg/ml (13,22,25).

Dichos resultados coinciden con los hallazgos del presente estudio, en el cual las mutaciones R90K, R131K, D59N y H97T fueron las más representativas, en tanto que las más frecuentes fueron la D59N (153/170), seguida por la R131K (101/170), la R90K (97/170), y la A118T (42/170). Mendz, *et al.*, reportaron una compilación de mutaciones en RdxA, incluidas aquellas que representan pérdida de la función de la proteína (4), datos que coinciden con los encontrados en este estudio, especialmente en cuanto a las mutaciones en las posiciones 56, 59, 90, 97, y 118, en las cuales se han documentado cambios en los diferentes aislamientos.

Las mutaciones H53R, M56I, L62V, A68V, H97T y G98S halladas en este estudio concuerdan con lo reportado en otros estudios en aislamientos resistentes al metronidazol (12,13,22); sin embargo, los aislamientos sensibles también han presentado estas mutaciones, lo cual confirmaría las limitaciones del empleo de las mutaciones en RdxA como único marcador de resistencia al metronidazol en *H. pylori* (22). Por ello, se necesitan estudios posteriores de transformación con cepas resistentes y sensibles, para avanzar en la comprensión del papel del gen *rdxA* en la resistencia a este medicamento (27).

Se ha reportado que las sustituciones e inserciones que causan un codón de terminación prematuro en la proteína RdxA están asociadas con el fenotipo de resistencia (27). Las mutaciones de los codones de parada encontradas en el presente estudio podrían estar asociadas con dicho fenotipo.

En un estudio reciente en Kuala Lumpur, en el cual se emplearon métodos fenotípicos, se estableció que la resistencia primaria al metronidazol



**Figura 1.** Posiciones variables relacionadas con los cambios en la proteína RdxA de *Helicobacter pylori* a partir del alineamiento de la secuencia traducida y analizada. A: secuencia *rdxA* de referencia 11638; B: secuencia de consenso, las letras en minúscula reflejan cambios en los aminoácidos y las letras en mayúscula muestran las zonas conservadas de RdxA; C: regiones poco variables de la proteína RdxA; D: regiones hipervariables de la proteína RdxA (R90, H97, R131)

**Cuadro 3.** Mutaciones de cambio de lectura (inserciones y sustituciones) relacionadas con la presencia de codones de parada en la proteína RdxA de *Helicobacter pylori* en la población de estudio

Tipo de mutación	Efecto	RdxA	n
<b>Inserción</b>			
A posición 141	Cambio de lectura, TAA CDP <sup>a</sup> posición 175	D 59*	1
A posición 135	Cambio de lectura, TAA CDP posición 148	Q 50*	1
A posición 193	Cambio de lectura, TAA CDP posición 193	E 74*	1
<b>Sustitución</b>			
C por T posición 148	TAA CDP posición 148	Q 50*	4
T por G posición 223	TAA CDP posición 223	E 75*	3
A por T posición 234	TAA CDP posición 234	K 78*	1
C por T posición 304	TAA CDP posición 304	N103*	1
T por A posición 479	TGA CDP posición 479	C159*	4

CDP<sup>a</sup>: codón de terminación  
 \*: codón de terminación en la proteína RdxA

**Cuadro 4.** Frecuencia de mutaciones en RdxA de *Helicobacter pylori* en lesiones gástricas

Lesión gástrica	n	Mutación puntual n (%)	Codón de parada n (%)	p
Gastritis crónica no atrofica	46	37 (80,4)	9 (19,6)	0,74
Gastritis crónica atrofica	23	16 (69,6)	7 (30,4)	
Metaplasia intestinal	78	63 (80,8)	15 (19,2)	
Displasia	9	8 (88,9)	1 (11,1)	
Cáncer gástrico	14	11 (78,6)	3 (21,4)	
Total	170	135 (79,4)	35 (21,4)	

p=0,74, prueba de  $\chi^2$

en aislamientos clínicos fue de 32,3 %. Al evaluar las variaciones en el gen *rdxA* y la correspondiente alteración de la proteína RdxA se encontraron cambios en los aminoácidos en 70,2 % de las cepas resistentes y mutaciones asociadas con codones de parada en 56,8 % (28), lo cual evidencia la importancia de evaluar la resistencia mediante pruebas moleculares (29).

En contraposición a estos hallazgos, en otros estudios se ha reportado la presencia de aislamientos resistentes en los cuales las proteínas RdxA estaban intactas, lo cual sugiere que habría otros genes involucrados en la resistencia al metronidazol, como el gen *frxA*, el cual participa en su activación en el interior de la célula (20,26). Se ha postulado que las mutaciones en la proteína FrxA pueden aumentar los valores de la CIM en los aislamientos resistentes y que las que ocurren en los codones de parada reforzarían el fenotipo resistente (25). Por consiguiente, no hay que desconocer el papel que cumplen otras nitrorreductasas como la *frxA*, la *fdxA* y la *rpsU* en la resistencia al metronidazol (26,27,30).

También, se ha postulado que existen otros mecanismos de resistencia diferentes a las proteínas RdxA o FrxA. Algunas mutaciones en genes relacionados con el potencial de oxidorreducción asociado con el metabolismo del metronidazol y sus productos intermedios activos contra la bacteria, por ejemplo, en la proteína Fur de *H. pylori*, pueden

afectar la sensibilidad al metronidazol al alterar el equilibrio de oxidorreducción mediado por esta proteína, y detener la activación de los productos bactericidas (31).

La combinación de metronidazol con otros antibióticos se utiliza ampliamente en el tratamiento estándar contra la infección por *H. pylori* y otras infecciones bacterianas anaerobias (32-37). Sin embargo, la resistencia de la bacteria al metronidazol es una de las causas del fracaso del tratamiento de dolencias gástricas (7). En los estudios en los que se emplearon métodos fenotípicos (dilución en agar) en Bogotá, Trespalacios, *et al.*, encontraron una prevalencia de resistencia al metronidazol de 81 % (38); en otro estudio en Pereira, la prevalencia fue de 88 % (29). Estos valores en diferentes poblaciones colombianas indican que la prevalencia de la resistencia a este nitroimidazol supera los límites máximos de 40 % recomendados por el consenso europeo de Maastricht IV (14,39). Según dichas recomendaciones, en áreas geográficas en donde la prevalencia de resistencia sea superior a 40 %, el metronidazol no puede utilizarse en los tratamientos empíricos (39).

A diferencia de los estudios mencionados en Colombia, en otros países latinoamericanos se han reportado datos distintos (8,34): en Chile, se encontró una resistencia al metronidazol de 44,9 %, en una región de México, del 37,1 %, detectada mediante la técnica de E-test (40), y en Brasil se reportaron valores de resistencia de 40,2 % (41). Estas diferencias entre poblaciones indican la importancia de vigilar los niveles de resistencia regional y local, ya que existen diferencias en la prevalencia de la resistencia según las áreas geográficas, lo cual significa que los resultados obtenidos en una región no pueden extrapolarse a otras y, por lo tanto, es fundamental disponer de información específica sobre los niveles de resistencia del microorganismo a los antibióticos usualmente utilizados en los esquemas de erradicación, con el fin de elegir aquellos eficaces y replantear el uso de algunos en el tratamiento empírico (7).

A nivel local no hay publicaciones sobre la resistencia al metronidazol, y aun así, se sigue utilizando frecuentemente en la práctica clínica como tratamiento de primera línea. Lo más preocupante es la ausencia de protocolos para verificar la eficacia de los tratamientos en la erradicación del microorganismo; de hecho, en un estudio en el cual se hizo una encuesta entre médicos generales, especialistas y gastroenterólogos, se encontró que

todavía se prescribe el metronidazol como tratamiento de primera línea para la infección por *H. pylori* (42).

En el presente estudio, se determinó por primera vez la frecuencia de las mutaciones en la nitrorreductasa RdxA en pacientes infectados por *H. pylori* en el departamento del Cauca. En esta zona del país, se ha reportado una gran prevalencia de *H. pylori*, y se ha sugerido que los aislamientos circulantes en su población están expuestos a la presión de selección dado el uso indiscriminado de antimicrobianos del tipo de los nitroimidazoles como tratamiento antiparasitario, así como contra infecciones gastrointestinales (42) y, especialmente, en infecciones urinarias y vaginales (8,34). Por ello, debe implementarse la vigilancia de las tasas de erradicación de *H. pylori* en poblaciones con riesgo de cáncer gástrico. La gran frecuencia de mutaciones (78 %) en la nitrorreductasa RdxA podría estar relacionada con la resistencia al metronidazol.

Se sugiere hacer estudios fenotípicos adicionales para relacionar los resultados de los análisis genéticos obtenidos con las CIM del antibiótico. En los eventuales estudios que se lleven a cabo, debería hacerse el antibiograma de las muestras seleccionadas en pacientes con recurrencia de la infección para establecer la relación con los hallazgos que aquí se presentan. Por ello, se propone emplear el cultivo bacteriano como una herramienta necesaria en pacientes en quienes el tratamiento ha fallado, según lo recomendado por Malfertheiner, *et al.* (14). Por lo pronto, el análisis de las mutaciones de la proteína RdxA es una excelente aproximación para analizar la resistencia en un gran número de muestras en poblaciones como la de Popayán, en donde los estudios son escasos y, además, no existen las condiciones para cultivar la bacteria. Dada la alta tasa de incidencia de la enfermedad gastrointestinal en Popayán, se deberían proponer programas de prevención de la infección por *H. pylori* y de promoción del uso adecuado de medicamentos.

En conclusión, este es el primer estudio en el departamento del Cauca en el cual se han evaluado las mutaciones de la nitrorreductasa RdxA, asociadas en diversos estudios con la resistencia de *H. pylori* al metronidazol en pacientes con dispepsia funcional. Se requieren nuevos estudios para evaluar el impacto de la resistencia en el fracaso del tratamiento en la población de esta región y para establecer la prevalencia de la resistencia a los otros antimicrobianos utilizados para combatir la infección.

## Agradecimientos

A los pacientes, por su participación en el estudio, y al personal del Hospital Universitario San José, del Susana López de Valencia y de la Unidad de Endoscopia ENDOVIDEO 2000 de Popayán, por su valiosa asistencia. A la Universidad del Cauca y a la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, por el apoyo en la ejecución de este proyecto. Al personal de Gastroenterología y Patología, a los colaboradores y auxiliares, y al jefe del Laboratorio de Genética Humana de la Universidad del Cauca.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún tipo de conflicto de intereses.

## Financiación

Este estudio fue financiado por el Programa de Salud de Colciencias como parte del proyecto “Mutación en los genes de resistencia antimicrobiana en *H. pylori* y su relación con la virulencia” (código 110351929123).

## Referencias

- Martínez-Júlvez M, Rojas AL, Olekhovich I, Angarica VE, Hoffman PS, Sancho J. Structure of RdxA—an oxygen-insensitive nitroreductase essential for metronidazole activation in *Helicobacter pylori*. FEBS J. 2012;279:4306-17. <http://dx.doi.org/10.1111/febs.12020>
- Gatta L, Vakili N, Vaira D. Treatment of *Helicobacter pylori* in Latin America. Lancet. 2012;379:407-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60181-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60181-0)
- Graham DY. *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: A model. Gastroenterol. 1997;113:1983-91. [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085\(97\)70019-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085(97)70019-2)
- Mendz GL, Mégraud F. Is the molecular basis of metronidazole resistance in microaerophilic organisms understood? Trends Microbiol. 2002;10:370-5. [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02405-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02405-8)
- Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: Molecular mechanisms and clinical implications. Lancet Infect Dis. 2006;6:699-709. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70627-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70627-2)
- Kaakoush NO, Asencio C, Mégraud F, Mendz GL. A redox basis for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:1884-91. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01449-08>
- Camargo MC, García A, Riquelme A, Otero W, Camargo CA, Hernández-García T, et al. The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: A systematic review in Latin America. Am J Gastroenterol. 2014;109:485-95. <http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2014.24>
- Martínez M, David J, Henao R, Consuelo S, Lizarazo R, Iván J. Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en América Latina y el Caribe. Rev Colomb Gastroenterol. 2014;29:218-27.
- Aldana LP, Kato M, Kondo T, Nakagawa S, Zheng R, Sugiyama T, et al. *In vitro* induction of resistance to metronidazole, and analysis of mutations in *rdxA* and *frxA* genes from *Helicobacter pylori* isolates. J Infect Chemother. 2005;11:59-63. <http://dx.doi.org/10.1007/s10156-004-0370>
- Mirzaei N, Poursina F, Moghim S, Rahimi E, Safaei HG. The mutation of the *rdxA* gene in metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates. Adv Biomed Res. 2014;3:90. <http://dx.doi.org/10.4103/2277-9175.128469>
- Marais A, Bilardi C, Cantet F, Mendz GL, Mégraud F. Characterization of the genes *rdxA* and *frxA* involved in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. Res Microbiol. 2003;154:137-44. [http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00030-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00030-5)
- Jenks P, Ferrero R, Labigne A. The role of the *rdxA* gene in the evolution of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. J Antimicrob Chemother. 1999;43:753-8. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/43.6.753>
- Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, Veldhuyzen van Zanten SJ, Berg DE, Hoffman PS. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. Mol Microbiol. 1998;28:383-93. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00806.x>
- Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/Florence consensus report. Gut. 2012;61:646-64. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302084>
- Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, Peto TE, Crook DW. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. Nature Rev Genet. 2012;13:601-12. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3226>
- Stolte M, Meining A. The updated Sydney system: Classification and grading of gastritis as the basis of diagnosis and treatment. Can J Gastroenterol. 2001;15:591-8. <http://dx.doi.org/10.1155/2001/367832>
- Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis: The updated Sydney system. Am J Surg Pathol. 1996;20:1161-81. <http://dx.doi.org/10.1097/0000478-199610000-00001>
- Acosta CP, Hurtado FA, Trespalacios AA. Determinación de mutaciones de un solo nucleótido en el gen 23S rRNA de *Helicobacter pylori* relacionadas con resistencia a claritromicina en una población del departamento del Cauca, Colombia. Biomédica. 2014;34:156-62. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1649>
- NCBI. *Helicobacter pylori* strain 26695-1MET, complete genome. Fecha de consulta: 26 de marzo de 2015. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP010436.1>
- Kwon D, Hulten K, Kato M, Kim J, Lee M, El-Zaatari F, et al. DNA sequence analysis of *rdxA* and *frxA* from 12 pairs of metronidazole-sensitive and-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:2609-15. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.9.2609-2615.2001>
- NCBI BLAST. NCBI BLAST: Basic Local Alignment Search

- Tool. Bethesda: National Library of Medicine. Fecha de consulta: 28 de junio de 2015. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
22. **Bereswill S, Krainick C, Stähler F, Herrmann L, Kist M.** Analysis of the *rdxA* gene in high-level metronidazole-resistant clinical isolates confirms a limited use of *rdxA* mutations as a marker for prediction of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;36:193-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00031-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00031-2)
  23. **Tomb J-F, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al.** The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 1997;388:539-47. <http://dx.doi.org/10.1038/41483>
  24. **EMBL-EBI.** CLUSTALW2. Fecha de consulta: 3 de agosto de 2015. Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
  25. **Kwon DH, Kato M, El-Zaatari FA, Osato MS, Graham DY.** Frame-shift mutations in NAD (P) H flavin oxidoreductase encoding gene (*frxA*) from metronidazole resistant *Helicobacter pylori* ATCC43504 and its involvement in metronidazole resistance. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;188:197-202. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09193.x>
  26. **Jeong J-Y, Mukhopadhyay AK, Dailidienė D, Wang Y, Velapatiño B, Gilman RH, et al.** Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA* (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 2000;182:5082-90. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.182.18.5082-5090.2000>
  27. **Solcà NM, Bernasconi MV, Piffaretti J-C.** Mechanism of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*: Comparison of the *rdxA* gene sequences in 30 strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:2207-10. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00015.x>
  28. **Teh X, Khosravi Y, Lee WC, Leow AH, Loke MF, Vadivelu J, et al.** Functional and molecular surveillance of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Kuala Lumpur. *PLoS One.* 2014;9:e101481. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101481>
  29. **Álvarez A, Moncayo JI, Santacruz JJ, Santacoloma M, Corredor LF, Reinoso E.** Antimicrobial susceptibility and mutations involved in clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from patients in the western central region of Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:4022-4. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00145-09>
  30. **Binh TT, Suzuki R, Trang TTH, Kwon DH, Yamaoka Y.** Search for novel candidate mutations for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* using next-generation sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:2343-8. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.04852-14>
  31. **Wu W, Yang Y, Sun G.** Recent insights into antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* eradication. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012:723183. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/723183>
  32. **Rimbara E, Fischbach LA, Graham DY.** Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8:79-88. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2010.210>
  33. **Heo J, Jeon SW.** Optimal treatment strategy for *Helicobacter pylori*: Era of antibiotic resistance. *World J Gastroenterol.* 2014;20:5654-9. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i19.5654>
  34. **Greenberg ER, Anderson GL, Morgan DR, Torres J, Chey WD, Bravo LE, et al.** 14-day triple, 5-day concomitant, and 10-day sequential therapies for *Helicobacter pylori* infection in seven Latin American sites: A randomised trial. *Lancet.* 2011;378:507-14. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60825-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60825-8)
  35. **Malfetheriner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al.** Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: The Maastricht III Consensus Report. *Gut.* 2007;56:772-81. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2006.101634>
  36. **Megraud F, Lamouliatte H.** Review article: The treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17:1333-43. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2036.2003.01592.x>
  37. **Graham DY, Fischbach L.** *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut.* 2010;59:1143-53. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2009.192757>
  38. **Trespalcios A, Otero W, Mercado M.** Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxi-cilina en pacientes colombianos. *Rev Colomb Gastroenterol.* 2010;25:31-8.
  39. **Almeida N, Donato MM, Romãozinho JM, Luxo C, Cardoso O, Cipriano MA, et al.** Beyond Maastricht IV: Are standard empiric triple therapies for *Helicobacter pylori* still useful in a South-European country? *BMC Gastroenterol.* 2015;15:23. <http://dx.doi.org/10.1186/s12876-015-0245-y>
  40. **Garza-González E, Pérez-Pérez G, Alanís-Aguilar O, Tijerina-Menchaca R, Maldonado-Garza H, Bosques-Padilla F.** Antibiotic susceptibility patterns of *Helicobacter pylori* strains isolated from northeastern México. *J Chemother.* 2002;14:342-5. <http://dx.doi.org/10.1179/joc.2002.14.4.342>
  41. **Ogata SK, Gales AC, Kawakami E.** Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* isolates from Brazilian children and adolescents: Comparing agar dilution, E-test, and disk diffusion. *Braz J Microbiol.* 2014;45:1439-48. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822014000400039>
  42. **Gómez M, Otero W, Gutiérrez Ó.** Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. Encuesta en un grupo de médicos generales y especialistas en Colombia. *Rev Colomb Gastroenterol.* 2007;22:7-16.

ARTÍCULO ORIGINAL

## Nueva reacción en cadena de la polimerasa múltiple para el diagnóstico específico de especies implicadas en la candidiasis humana

Liliana Torcoroma García<sup>1,2</sup>, Liany Johanna Luna<sup>2</sup>, Tania Katherine Velasco<sup>2</sup>, Beatriz Elena Guerra<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Maestría en Investigación en Enfermedades Infecciosas, Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia

<sup>2</sup> Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia

<sup>3</sup> Grupo de Investigación en Biotecnología-Microbiota, Programa de Microbiología Industrial, Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia

**Introducción.** Las candidiasis son un grupo de infecciones oportunistas causadas por levaduras del género *Candida*. *Candida albicans* es la especie de mayor prevalencia en las infecciones superficiales y profundas. Sin embargo, en la última década, la frecuencia de especies diferentes a *C. albicans* ha aumentado y, por ende, su relevancia clínica, lo cual exige la utilización de técnicas diagnósticas que permitan su detección y el tratamiento adecuado de los pacientes afectados.

**Objetivo.** Diseñar y optimizar una técnica de reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR múltiple) considerando parámetros termodinámicos para la detección simultánea de cinco especies de *Candida* relevantes en la etiología de la candidiasis humana.

**Materiales y métodos.** Para el diseño de los cebadores se consideraron restricciones físicas y termodinámicas que afectan la PCR múltiple, usando el programa Gene Runner y la herramienta Multi-PSOS. Como plantillas se utilizaron la región transcrita interna 2 (ITS2) (AJ249486.1) para *C. albicans* y la topoisomerasa II (TOPII) para *C. parasilopsis* (AB049144.1), *C. krusei* (AB049139.1), *C. tropicalis* (AB049141.1) y *C. guilliermondii* (AB049145.1), y como moldes, extractos de ADN total obtenidos de cepas ATCC y de aislamientos clínicos de las especies de *Candida*.

**Resultados.** Se diseñaron diez cebadores para la amplificación simultánea de las especies de *Candida*. Se obtuvo el siguiente patrón de bandas: *C. albicans* (206 pb), *C. guilliermondii* (244 pb), *C. tropicalis* (474 pb), *C. parasilopsis* (558 pb) y *C. krusei* (419 pb).

**Conclusión.** El ensayo diseñado de PCR múltiple permitió la amplificación simultánea y eficiente de todos los amplicones correspondientes a las especies estudiadas de *Candida*, así como su adecuada resolución en gel de agarosa al 1,3 %.

**Palabras clave:** candidiasis/diagnóstico; reacción en cadena de la polimerasa; *Candida albicans*; diagnóstico molecular.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3202>

### A new multiplex PCR for species-specific diagnosis of human candidiasis

**Introduction:** Candidiasis is a group of opportunistic infections caused by yeasts belonging to the genus *Candida*. *Candida albicans* is the most prevalent species in both superficial and deep infections, however, the clinical importance of non-*albicans* *Candida* has increased during the last decade, driving an urgent need for diagnostic tests that allow for species-level resolution and selection of the optimum therapeutic approach.

**Objective:** To design and to optimize a new multiplex PCR assay for the simultaneous identification of the five most relevant species of *Candida* involved in human candidiasis etiology.

**Materials and methods:** For primers design, the physical and thermodynamic restrictions that affect multiplex PCR performance were analyzed using Gene Runner and Multi-PSOS. As templates, the internal transcribed region 2 (ITS2) was selected for *C. albicans* (AJ249486.1), and topoisomerase II (TOPII) for *C. parasilopsis* (AB049144.1), *C. krusei* (AB049139.1), *C. tropicalis* (AB049141.1), and *C. guilliermondii* (AB049145.1). We used ATCC strains of all these five species and clinical isolates as templates.

**Results:** We designed ten oligonucleotides for the simultaneous amplification of the *Candida* species. The electrophoresis band profile was: *C. albicans* (206 bp), *C. guilliermondii* (244 bp), *C. tropicalis* (474 bp), *C. parasilopsis* (558 bp), and *C. krusei* (419 bp).

#### Contribución de los autores:

Liliana Torcoroma García: diseño de las pruebas moleculares, orientación en aspectos teóricos y experimentales, y escritura del artículo

Liany Johanna Luna y Tania Katherine Velasco: diseño y ejecución de pruebas moleculares

Beatriz Elena Guerra: soporte técnico, orientación teórica y experimental, y revisión del artículo

**Conclusion:** The new multiplex PCR assay designed in this study allowed a simultaneous and efficient amplification of the amplicons corresponding to the five species of *Candida* under study, with an adequate resolution in standard agarose gel.

**Key words:** Candidiasis/diagnosis; polymerase chain reaction; *Candida albicans*; molecular diagnosis.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3202>

Las candidiasis son un grupo de infecciones oportunistas comunes de gran variabilidad clínica que incluye desde manifestaciones leves a moderadas en mucosas, piel, orofaringe, cavidad oral y esófago, hasta micosis invasivas, especialmente en pacientes hospitalizados con enfermedades graves, pacientes con sida y otros con compromiso inmunológico (1,2). La etiología de estas infecciones se ha asociado con más de 17 especies, siendo *Candida albicans* la de mayor relevancia epidemiológica, pues se la relaciona con, aproximadamente, 50 % de los casos de infecciones profundas provocadas por *Candida* spp. (3,4). Sin embargo, en las últimas décadas, el conglomerado de especies diferentes a *C. albicans* ha emergido como patógeno principal en la etiología de la candidiasis sistémica (5-7).

En la actualidad, el método de referencia para el diagnóstico de la candidiasis invasiva es el cultivo microbiológico de especímenes sanguíneos y de otras muestras procedentes de sitios estériles. Esta forma de diagnóstico tiene algunas desventajas, entre ellas: a) la falta de sensibilidad (alrededor del 50%) asociada con la baja magnitud y corta duración de la candidemia (8-10); b) las demoras derivadas de una extensa fase de latencia del crecimiento en este tipo de microorganismos, lo cual puede retrasar el tratamiento oportuno y pertinente; c) la necesidad, en algunos casos, de procedimientos invasivos para tener acceso a tejidos o líquidos estériles, y d) los falsos negativos asociados al uso profiláctico o empírico de antifúngicos en pacientes con factores de riesgo de candidemia (11).

En consecuencia, la búsqueda y validación de nuevos métodos diagnósticos que permitan la detección rápida y sensible de los agentes etiológicos de las candidiasis profundas a nivel de especie, continúa siendo un problema. Recientemente, han surgido herramientas diagnósticas que han demostrado mayor sensibilidad que la de los cultivos tradicionales (12-14). Estos métodos incluyen la cuantificación

de partículas específicas provenientes de la pared celular de *Candida* spp., tales como el  $\beta$ -1,3-D-glucano, pero en estudios anteriores se evidenció su poca sensibilidad (<60 %) y especificidad (<50 %) para el caso de las candidiasis profundas (12,14).

Por otro lado, los ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de moléculas de ADN a partir de muestras sanguíneas han registrado altos porcentajes de sensibilidad y especificidad, con límites de amplificación de secuencias génicas que rondan las 80 copias/ml (0,4 CFU/ml) (14). Sin embargo, en infecciones de diversa etiología, tales como las candidiasis, es necesario recurrir a técnicas de PCR múltiple que permitan la amplificación simultánea, específica y sensible de varias secuencias blanco en reacciones únicas y rápidas (15).

En este contexto, este trabajo tuvo como objetivo diseñar un ensayo de PCR múltiple fundamentado en secuencias blanco específicas para las cinco especies del género *Candida* de mayor relevancia a nivel hospitalario: *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. parasilopsis* y *C. krusei* (4,7). El diseño de las secuencias cebadoras se hizo con ayuda de programas de bioinformática de acceso libre (Gene Runner™, <http://www.generunner.net/>) y algoritmos de optimización de secuencias cebadoras para ensayos de PCR múltiple (Mult-PSOS) (16). Las condiciones de ensayo (concentraciones de reactivos y parámetros del ciclo) se estandarizaron para la amplificación eficiente de todas las secuencias blanco en una única reacción, garantizando una sensibilidad y una eficiencia suficientes para su interpretación mediante geles de agarosa comunes. El desempeño *in vitro* de las secuencias cebadoras en el ensayo múltiple se determinó usando, como molde para la reacción, el ADN extraído de las cepas de referencia (ATCC) y de aislamientos clínicos. Además, se usó ADN total extraído de muestras sanguíneas de pacientes con hemocultivos positivos para *Candida* spp.

## Materiales y métodos

### Levaduras

En los experimentos de microbiología convencional y molecular, se utilizaron cinco cepas ATCC

#### Correspondencia:

Liliana Torcoroma García, Programa de Maestría en Investigación en Enfermedades Infecciosas, Universidad de Santander, Calle 70 N° 55-210, Bucaramanga, Colombia  
Teléfono: (577) 651 6500, extensión 1212; fax: (577) 651 6492  
[l.torcoroma@udes.edu.co](mailto:l.torcoroma@udes.edu.co)

Recibido: 21/12/15; aceptado: 04/08/16

del género *Candida*: *C. albicans* (HQ876043.1), *C. parasilopsis* (ATCC58904), *C. krusei* (AY126274.1), *C. tropicalis* (ATCC20336) y *C. guilliermondii* (NUM4). También, se utilizaron aislamientos clínicos de levaduras provenientes de pacientes con diagnóstico de candidiasis profunda internados en hospitales regionales para los ensayos confirmatorios y de validación de la prueba. En los ensayos de especificidad, se usaron extractos de ADN total proveniente de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra* y *C. lusitania*.

### **Identificación de las especies de *Candida* con base en las características morfológicas y fisiológicas**

Las cepas ATCC y los aislamientos clínicos de mucosa oral se sembraron en medios de agar cromogénico CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> de BioMérieux (CHROMagar, Microbiology, Francia). Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente durante 48 horas y se hizo una identificación presuntiva de las especies de *Candida* mediante observación macroscópica de la coloración de la colonia en el medio. Para las pruebas de identificación, se sembraron colonias aisladas en agar de dextrosa Sabouraud con suplemento de antibióticos e incubadas a temperatura ambiente durante 24 horas. La identificación mediante ensayos fisiológicos se hizo con la prueba de tubo germinal. Para ello, se inocularon colonias individuales en 0,5 ml de suero humano, se incubaron a 37 °C durante dos a cuatro horas, y se observaron entre lámina y laminilla con microscopio óptico a 40X y 100X.

### **Detección de las especies de *Candida* mediante PCR múltiple**

Para el diseño por simulación computacional de los cebadores y de los experimentos de PCR múltiple, se escogieron secuencias consignadas en el GenBank<sup>™</sup> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Para *C. albicans*, se seleccionó la región transcrita interna 2 (ITS2) (AJ249486.1) y la secuencia génica de la topoisomerasa II (TOPII) para *C. parasilopsis* (AB049144.1), *C. krusei* (AB049139.1), *C. tropicalis* (AB049141.1) y *C. guilliermondii* (AB049145.1).

Con el fin de optimizar el diseño de las diez secuencias cebadoras (un par específico para cada especie de *Candida*), se consideraron parámetros relevantes descritos anteriormente (16-18) para experimentos de PCR múltiple, tales como: a) un tamaño del cebador de 18 a 26 pb, con una diferencia máxima de 6 pb entre cebadores; b) un porcentaje de citosina-guanina de 40 a 60 %;

c) una temperatura de fusión de 45 a 65 °C, con una diferencia máxima de 6 °C entre cebadores; d) ausencia de repeticiones de bases en más de cuatro bases seguidas; e) presencia de G, C, GC o CG en la extremidad 3'; f) ausencia de estructuras intermoleculares o intramoleculares con G relevantes ( $\Delta G \geq -6$  kcal/mol) (14,17,18); g) una secuencia blanco con un grado de variación suficientemente significativo para la identificación específica del organismo y, en lo posible, con múltiples copias en el genoma, y h) una diferencia mínima de 50 pb entre amplicones que permita la resolución de las bandas en geles de agarosa comunes.

Para ello, se evaluó el ajuste de los parámetros de restricción del diseño de las secuencias cebadoras mediante la aplicación del algoritmo Multi-PSOS, desarrollado recientemente en nuestro grupo para ensayos de PCR múltiple (Multi-PSOS) (16). El cumplimiento de los parámetros de ajuste se verificó mediante el programa Gene Runner<sup>™</sup> (<http://www.generunner.net/>).

### **Extracción del ADN genómico**

Para la obtención de las muestras de ADN total, se utilizaron cultivos líquidos de levaduras (ATCC y aislamientos clínicos) en fase logarítmica ( $DO_{600}$ ) sembrados en caldo Luria Bertani (BioMérieux), los cuales se procesaron con el estuche comercial QIAamp ADN Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante, con las siguientes modificaciones: la degradación de la pared celular fúngica se hizo mediante procedimientos repetitivos (siete veces) de choque térmico en nitrógeno líquido durante 30 segundos, seguidos de incubación a 42 °C durante dos minutos.

El ADN obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso como molde en los ensayos de amplificación por PCR. Para la extracción del ADN total a partir de muestras de sangre total anticoagulada con EDTA, se usó el estuche QIAamp DNA Blood Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen) según las recomendaciones del fabricante. El ADN se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis (ThermoScientific) y se analizó con el programa NanoDrop 2000/2000c (ThermoScientific). Todas las muestras sanguíneas se procesaron antes de cumplirse los seis meses de su recolección.

### **Ensayos de PCR múltiple**

Para las reacciones de PCR múltiple, se preparó una mezcla que contenía 4  $\mu$ l de ADN molde (50-200 ng ADN), 0,4 a 0,6 mM de cada cebador, 1,5 U

de GoTaq Flexi ADN polimerasa (Promega), y 1,5 mM de cloruro de magnesio para un volumen final de 50  $\mu$ l.

Las reacciones cíclicas de PCR se programaron en el termociclador (Labnet International, Inc. Multigene) con las siguientes condiciones: un ciclo de cinco minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos a 94 °C durante un minuto, a 53 °C durante 50 segundos y a 72 °C durante 80 segundos; por último, hubo una fase posterior a la amplificación a 72 °C durante siete minutos.

La calidad y el tamaño de los amplicones se verificaron mediante electroforesis de agarosa al 1,3 %, y se revelaron con SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probe, Invitrogen Life Technologies). Se usaron los marcadores de peso molecular de 1 kb y 100 pb (DNA Ladder, Thermo Scientific). La especificidad de la secuencia de los cebadores se verificó mediante simulación computacional comparando las secuencias con bases de datos genómicos de humanos, bacterias, hongos y protozoos con la herramienta Blast ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_SPEC=WGS&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=WGS&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch)).

## Resultados

### Extracción del ADN

Los métodos de extracción propuestos permitieron la obtención de muestras de ADN total de buena calidad, cuya pureza se verificó mediante electroforesis de agarosa. En los análisis cuantitativos realizados mediante el programa del espectrofotómetro Nano Drop 2000/2000c (ThermoScientific), se verificó que las muestras de ADN extraído a partir de colonias puras tenían concentraciones variables entre 70 y 800 ng/ $\mu$ l, siendo *C. albicans* la levadura con mayor rendimiento en todos los procesos de extracción y *C. parasilopsis*, la especie con menor rendimiento. En el caso de los extractos de ADN total a partir de muestras sanguíneas humanas, se obtuvieron rendimientos superiores, los cuales oscilaron entre 300 y 850 ng/ $\mu$ l.

### Diseño de los oligonucleótidos iniciadores

En los cuadros 1 y 2 se presentan las secuencias cebadoras diseñadas en este estudio para los ensayos de PCR múltiple, y el resumen de algunos de los parámetros fisicoquímicos y estructurales obtenidos en el análisis de estos oligonucleótidos mediante el programa Gene Runner 3.01® (<http://www.generunner.net/>). Se han determinado parámetros similares con esta misma herramienta

computacional usando secuencias cebadoras previamente descritas en ensayos de PCR para la identificación de especies de *Candida* (19-23). Estos resultados se incluyeron en el cuadro 1 con fines de comparación.

### Especificidad y sensibilidad de los cebadores diseñados por bioinformática para la ITS 2 y la topoisomerasa II

Para determinar la especificidad y la sensibilidad de los cebadores durante las reacciones de amplificación, se hicieron montajes de PCR usando como molde diversas concentraciones de ADN total (entre 50 y 100 ng) provenientes de las cepas ATCC y de aislamientos clínicos de mucosas de *C. albicans*, *C. parasilopsis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* y *C. krusei*.

Por otro lado, se obtuvieron extractos de ADN total a partir de muestras sanguíneas de pacientes con hemocultivos positivos para *Candida* spp., los cuales se usaron como molde para la prueba molecular, con el objetivo de determinar su aplicabilidad en muestras biológicas. Se probaron diez muestras, de las cuales seis fueron positivas para *C. albicans*, dos para *C. tropicalis*, una para *C. parasilopsis* y una para *C. krusei*. La figura 1 muestra el perfil electroforético en gel de agarosa al 1,3 % de los amplicones obtenidos en las reacciones de la PCR múltiple.

Los resultados de Blastn ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_SPEC=WGS&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=WGS&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch)) evidenciaron que no había regiones significativas de homología cruzada en las secuencias de oligonucleótidos diseñadas para este estudio. La especificidad del ensayo de la PCR múltiple propuesto también se confirmó *in vitro* mediante el montaje de reacciones con las mismas condiciones descritas anteriormente, pero usando como molde extractos de ADN total provenientes de levaduras de *S. cerevisiae*, *R. rubra*, *C. lusitaniae*. Los resultados de estas reacciones no evidenciaron la presencia de ninguna banda de amplificación en el análisis electroforético.

### Correlación de la detección microbiológica convencional y la molecular

En la correlación de los resultados obtenidos mediante la detección fenotípica y la molecular, se evidenció la formación del tubo germinal con formación rápida de filamentos (dos horas) en levaduras de *C. albicans*, y con formación lenta de filamentos (cuatro horas) en las especies *C. krusei* y *C. tropicalis*. Las características morfológicas

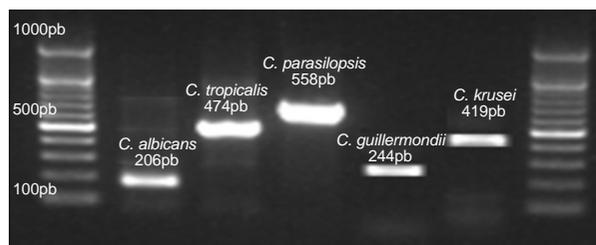
**Cuadro 1.** Comparación de los parámetros físicos y estructurales de las secuencias cebadoras de la PCR múltiple con los de otros estudios reportados

Levadura	Gen	Cebador	T <sub>m</sub>	GC %	ΔG (kcal/mol)	Dímeros #	Repeticiones de bases #	Bucles en horquilla #	Bucles en bulto #	Bucles internos #	Amplicón (# bases)	Ref	
													Secuencia 5'-3'
C.a	ITS2	F	CGCATCGATGAAGAACGCAGC	21	55	57	-9.6	1	-	-	-	206	Este estudio
		R	AGACGGTAGTGGTAAGGCGGGAT	23	55	57	-7.5	-	-	-	-	-	
C.p	TOP2	F	AGCAATCAAGGAGAGTTCGCCA	22	55	54	-9.6	-	-	-	-	558	
		R	CTCGTACCAGCCTTGTTCATC	23	53	52	-5.3	2	-	-	-	-	
C.k	TOP2	F	CCCTCAAGAAAACAGACGGCG	21	54	57	-11.3	-	1	-	-	419	
		R	TTAGAGGCATCGTTCCGGGC	21	56	57	-5.7	1	-	-	-	-	
C.g	TOP2	F	ACCCTGCATTACCTCACAAAC	22	51	50	-5.2	1	-	-	-	244	
		R	CCCGCCTTATTAGCATCAACC	21	51	52	-12.6	-	-	-	-	-	
C.t	TOP2	F	GCATGGAGAGATGGTGAAGGTGC	23	55	57	-7.9	5	-	2	-	474	
		R	TTCTTTCTCCGCTTATTG	20	45	40	-4.7	3	-	1	-	1	
UNI1	ITS1	F	GTCAAACCTGGTCATTTA	18	31	33	-4.7	4	-	1	1	2	929* (19,20)
C.a*	ITS1	R	AGCTGCCGCCAGAGGTCTAA	20	52	60	-5.4	5	1	1	-	1	
C.gl*	ITS1	R	TTGTCTGAGCTCGGAGAGAG	20	44	55	-4.6	9	-	2	9	1	590*
C.t*	ITS1	R	GATTTGCTTAATTGCCCCAC	20	47	45	-10.6	4	1	1	-	1	583*
C.p*	ITS1	R	GTCAACCGATTATTTAATAG	20	34	30	-3.7	4	-	1	1	2	570*
C.g*	ITS1	R	TTGGCCTAGAGATAGTTGG	20	44	50	-7.9	4	-	1	-	2	668*
UNI2	ITS2	F	TTCTTTCTCCGCTTATTG	20	45	40	-4.7	-	1	-	-	-	590**
C.k**	ITS2	R	CTGGCCGAGCGAACTAGACT	20	49	60	-3.6	2	-	-	-	-	
C.a	ITS1	F	TTTATCAACTTGTACACCCAGA	22	42	36	-6.4	4	-	-	-	2	272 (21,22)
		R	ATCCCGCCTTACCACTACCG	20	50	60	-6.8	-	-	-	-	-	
C.gl	ITS1	F	TTATCACAGACTCGACT	20	39	45	-6.3	3	-	-	-	1	423
		R	CCCACATACTGATATGGCCTACAA	24	50	46	-5.7	6	-	3	-	1	
C.t	ITS1	F	CAATCCTACCGCCAGAGTTAT	22	49	50	-5.3	4	-	2	-	-	357
		R	TGGCCACTAGCAAAATAAGCGT	22	51	46	-7.4	2	1	-	-	-	
C.p	ITS1	F	GCCAGAGATTAACCTCAACCA	22	46	41	-7.0	3	-	1	-	2	297
		R	CCTATCCATTAGTTTATACTCCGC	24	47	41	-9.3	7	-	3	2	1	
C.k	ITS1	F	ACTACACTGCGTGAGCGGAA	20	48	55	-9.9	2	-	1	-	1	362
		R	ACTACACTGCGTGAGCGGAA	20	48	55	-9.9	2	-	1	-	1	

T<sub>m</sub>: temperatura de fusión calculada con 250 mM de NaCl; F: cebador sentido; R: cebador antisentido; C.a: *C. albicans*; C.p: *C. parasilopsis*; C.k: *C. krusei*; C.g: *C. guilliermondii*; C.t: *C. tropicalis*; UNI1: Universal 1; UNI2: Universal 2; C.gl: *C. glabrata*; C.l: *C. lusitanae*; C.d: *C. dubliniensis*; ITS1: espaciador interno transcrito (*Internal transcribed spacer*) 1; ITS2: espaciador interno transcrito (*Internal transcribed spacer*) 2; C.pel: *C. pelliculosa*  
\* Acoplado con el cebador sentido: UNI1; \*\* Acoplado con el cebador sentido: UNI2

**Cuadro 2.** Características microscópicas de las especies de *Candida* a partir del cultivo

Especie	Blastoconidias	Hifas	Pseudohifas	Arthroconidias	Clamidioconidias	Capacidad de formar filamentos
<i>C. albicans</i>	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Rápida
<i>C. guilliermondii</i>	Sí	No	No	No	No	No
<i>C. krusei</i>	Sí	No	No	No	No	Lenta
<i>C. parasilopsis</i>	Sí	No	No	No	No	No
<i>C. tropicalis</i>	Sí	No	No	No	No	Muy lenta

**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,3 % de los productos de la PCR múltiple para la identificación de *Candida* spp. Marcador de peso Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Invitrogen)

coincidieron con los resultados moleculares, ya que no se observó formación de arthroconidias en ninguna de las especies ensayadas. Otras estructuras fúngicas, como hifas, pseudohifas y clamidioconidias, se observaron únicamente en *C. albicans* (cuadro 2).

## Discusión

En los últimos años, la incidencia de la candidiasis invasiva se ha incrementado ostensiblemente; por ejemplo, en los hospitales de Estados Unidos

constituye la cuarta causa de infección del torrente circulatorio (6), con tasas de mortalidad que superan el 40 % (5). Sin embargo, a pesar de su importancia epidemiológica y clínica, el diagnóstico de la candidiasis profunda es difícil, frecuentemente tardío, y se basa principalmente en la historia clínica, en biopsias y en cultivos micológicos (9,24).

Debido al aumento de las candidiasis invasivas asociadas a cepas diferentes a *C. albicans*, la tipificación de la etiología de este tipo de infecciones a nivel de especie tiene mayor relevancia, especialmente por el comportamiento diferenciado de los distintos tipos de *Candida* en cuanto a su perfil de resistencia a los antifúngicos, así como por la potencial virulencia del microorganismo, y las características clínicas y de pronóstico de la infección (25,26). Es el caso de la sensibilidad diferenciada frente al fluconazol, con especies muy resistentes (casi de 100 % en *C. krusei*, y de 50 % en *C. guilliermondii* y *C. glabrata*), y otras muy sensibles, como *C. parasilopsis*, *C. albicans* y *C. tropicalis*, que presentan porcentajes mínimos de resistencia (25,27). Asimismo, se ha descrito la disminución de la sensibilidad a las equinocandinas y a la anfotericina B en cepas de *C. parapsilosis* (26) y *C. krusei* (28), respectivamente.

Por otro lado, se han atribuido características clínicas específicas a las infecciones causadas por determinadas especies de *Candida*: *C. parasilopsis* se ha asociado principalmente con infecciones en neonatos, y con infecciones relacionadas con implantes y soluciones contaminadas; *C. tropicalis* se ha relacionado con infecciones profundas en personas inmunosuprimidas; *C. albicans*, especie de mayor ubicuidad, se ha asociado con infecciones mucocutáneas, pielonefritis, peritonitis, infecciones hematógenas, candidemia, meningitis e infecciones hepatoesplénicas; *C. krusei* se ha relacionado con candidemia, endoftalmítis y diarrea en neonatos, y *C. guilliermondii*, con candidiasis sistémica y endocarditis en adictos a drogas intravenosas (29). Además, se ha reportado que en los pacientes con cáncer, aquellos que sufren de leucemia presentan una mayor propensión a infecciones causadas por *C. albicans* o *C. tropicalis* (30). Asimismo, las personas con trasplante de médula ósea son más propensas a infecciones por *C. krusei* (31).

En este mismo sentido vale la pena mencionar que, aunque la evolución de las infecciones profundas por *Candida* guarda relación directa con ciertas condiciones del paciente (edad avanzada, enfermedades graves de base y tratamientos

prolongados con antibióticos, entre otras), la mortalidad que se les atribuye varía según la especie (29,32). Así, las candidemias causadas por especies resistentes a triazoles (*C. krusei* o *C. glabrata*) tienen un peor pronóstico que aquellas originadas por especies sensibles (29,33), entre las cuales se ha reportado que *C. parasilopsis* causa las infecciones con la evolución clínica más favorable (29,34).

Como puede verse, la caracterización de las especies implicadas en un episodio de candidiasis profunda puede ser determinante para el éxito de las intervenciones terapéuticas y el seguimiento oportuno de un paciente. Las pruebas de laboratorio rutinarias para la detección de especies de *Candida* se basan actualmente en técnicas microbiológicas para la producción del tubo germinal, tamización mediante medios cromogénicos, como el CHRO Magar *Candida*<sup>®</sup> (Biomerieux), y pruebas bioquímicas.

Sin embargo, estos ensayos muestran desventajas, entre ellas, las siguientes: a) la poca sensibilidad en aislamientos primarios (8,11), ya que frecuentemente la positividad de los cultivos de secreciones o tejidos estériles se hace aparente únicamente en la fase tardía de la infección (9,24,35); b) la limitada especificidad ligada al alto riesgo de contaminación (9); c) la gran variabilidad de los morfotipos, lo cual puede producir resultados falsos en los ensayos de asimilación de los sustratos cromogénicos y en las pruebas de tubo germinal (5 a 10 % de las cepas de *C. albicans* no producen tubo germinal y, también, es probable encontrar falsos positivos en *C. tropicalis* y *C. parasilopsis*) (36), y d) la necesidad de periodos de casi 72 horas para el completo crecimiento e identificación de los microorganismos.

En la práctica clínica, todas estas dificultades para el diagnóstico imponen el tratamiento empírico de las candidiasis profundas, a pesar de su alto costo y su significativa toxicidad (37), con las consecuentes fallas asociadas al retraso en el inicio de un tratamiento antifúngico adecuado, las cuales se traducen en el aumento de la mortalidad hospitalaria en pacientes con candidiasis (40 a 78 %) (38), incluso, cuando se emplean los nuevos medicamentos antifúngicos.

En este contexto, el diagnóstico de la candidiasis profunda sigue siendo un problema (24) que exige la adopción de nuevos métodos diagnósticos de mayor sensibilidad y especificidad para la oportuna detección de las especies de *Candida* implicadas en este tipo de infecciones. En este sentido, las

técnicas moleculares, en especial la PCR y sus diversas variantes, han revolucionado, sin duda alguna, el diagnóstico y el manejo clínico de las infecciones fúngicas, ofreciendo una plataforma ideal para el desarrollo de herramientas de caracterización a nivel de especie de agentes infecciosos de interés clínico. Debido a sus indudables ventajas, como su facilidad de empleo, mayor rapidez, menor riesgo de contaminación y gran especificidad y sensibilidad, en las últimas décadas la PCR ha pasado a sustituir las técnicas microbiológicas tradicionales y hoy constituye la prueba de referencia para la detección de las especies causantes de un amplio número de enfermedades infecciosas (39-41).

En este estudio se describió una nueva PCR múltiple para la detección rápida, específica y sensible de las especies de *Candida* causantes de infecciones de importancia hospitalaria. Para ello, se diseñaron cebadores específicos que amplifican las secuencias ITS2 y topoisomerasa II de las especies *C. krusei*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parasilopsis* y *C. guilliermondii*. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se optimizaron para garantizar la sensibilidad y la especificidad con base en todos los parámetros de diseño termodinámicos y de resolución descritos por García, *et al.* (16), y por Allawi, *et al.* (17), mediante la evaluación de las secuencias diseñadas con el algoritmo computacional Mult-PSOS (16). Los análisis comparativos por simulación computacional de los parámetros físicos y estructurales de las secuencias de la PCR múltiple en este estudio se compararon con las secuencias reportadas con otros métodos (19-23). Como queda evidenciado en el cuadro 1, los resultados predijeron una mayor eficiencia de nuestro ensayo, pues las secuencias diseñadas presentaron: a) una menor formación de estructuras secundarias (dímeros, bucles internos, bucles en horquilla y bucles en bulto), las cuales afectan negativamente la sensibilidad de la corrida; b) un mejor ajuste de las temperaturas de fusión (en su mayoría superiores a los 50 °C y con menores diferencias entre el conjunto de cebadores) y del porcentaje de GC (entre 40 y 60 %), y c) una diferencia entre el tamaño de amplicones que permitió su diferenciación en geles comunes de agarosa (cerca a las 50 pb).

Por otra parte, los ensayos *in vitro* corroboraron que el método molecular propuesto permitió la detección con gran sensibilidad (12,5 ng/μL de ADN, menos de una célula/ml) y especificidad de las cinco especies estudiadas de *Candida*. Sin

embargo, dado que los métodos moleculares, así como la detección de partículas provenientes de la pared (por ejemplo, la determinación del β-D glucano), no permiten la distinción de las infecciones activas de aquellas de reciente resolución, es necesario utilizar estos métodos como ensayos complementarios del diagnóstico microbiológico tradicional, ya que incrementan la sensibilidad de los cultivos casi en un 100 % en los casos de micosis invasivas (14). Esto es muy significativo si se tiene en cuenta la poca sensibilidad reportada para el hemocultivo (20 a 50 %) en pacientes con infección confirmada en órganos profundos o por necropsia (9,11), en tanto que, en los mismos casos, los ensayos de PCR han evidenciado rangos de sensibilidad muy superiores (de 73 a 95 %) (13,14).

Por último, es importante señalar que, dado que el desempeño de la PCR múltiple se ve sensiblemente afectado por los parámetros de diseño de la prueba –principalmente los relacionados con el comportamiento termodinámico de las secuencias cebadoras y con la selección adecuada de las secuencias blanco para garantizar una correcta resolución–, es necesario hacer estudios comparativos con muestras clínicas mediante las pruebas de PCR múltiple reportadas en los diversos estudios. Ello permitiría evaluar el desempeño de los diferentes métodos descritos para determinar su validez y aplicabilidad rutinaria en el diagnóstico oportuno de infecciones profundas ocasionadas por especies de *Candida*.

### Agradecimientos

Al Laboratorio de Investigaciones Biomédicas y Biotecnológicas de la Universidad de Santander, por el préstamo de sus instalaciones para la realización de los ensayos y pruebas moleculares.

### Conflicto de intereses

Los autores de este trabajo declaramos que no existe conflicto de intereses.

### Financiación

Este proyecto fue financiado con fondos del Grupo de Investigación Clínico Clini-Udes y del Grupo de Biotecnología-Microbiota de la Universidad de Santander.

### Referencias

1. Bassetti M, Taramasso L, Nicco E, Molinari MP, Mussap M, Viscoli C, *et al.* Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. PLoS One. 2011;6:e24198. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024198>

2. **Cassone A, Cauda R.** *Candida* and candidiasis in HIV-infected patients: Where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders. *AIDS*. 2012;26:1457-72. <http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283536ba8>
3. **Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche HU, Quan SP, et al.** Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) Registry, 2004–2008. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74:323-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.003>
4. **Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, et al.** Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004-2008. *PLoS One*. 2014;9:e101510. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101510>
5. **Pappas PG.** Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North America*. 2006;20:485-506. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2006.07.004>
6. **Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, et al.** Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. *Clin Infect Dis*. 2009;48:1695-703. <http://dx.doi.org/10.1086/599039>
7. **Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortés J, Zurita J, et al.** Epidemiology of candidemia in Latin America: A laboratory-based survey. *PLoS One*. 2013;8:e59373. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059373>
8. **Berenguer JM, Buck F, Witebsky F, Stock PA, Pizzo, Walsh TJ.** Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of tissue-proven invasive candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1993;17:103-9. [http://dx.doi.org/10.1016/0732-8893\(93\)90020-8](http://dx.doi.org/10.1016/0732-8893(93)90020-8)
9. **Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K, et al.** Trends in the post-mortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect*. 1996;33:23-32. [http://dx.doi.org/10.1016/S0163-4453\(96\)92700-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0163-4453(96)92700-0)
10. **Fuller DD, Davis TE, Denys GA, York MK.** Evaluation of BACTEC MYCO/F Lytic medium for recovery of mycobacteria, fungi, and bacteria from blood. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2933-6. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.8.2933-2936.2001>
11. **Kami M, Machida U, Okuzumi K, Matsumura T, Mori SI, Hori A, et al.** Effect of fluconazole prophylaxis on fungal blood cultures: An autopsy-based study involving 720 patients with haematological malignancy. *Br J Haematol*. 2002;117:40-6. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03414.x>
12. **Alam FF, Mustafa AS, Khan ZU.** Comparative evaluation of (1, 3)- $\beta$ -D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. *BMC Infect Dis*. 2007;7:103. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-7-103>
13. **Avni T, Leibovici L, Paul M.** PCR diagnosis of invasive candidiasis: Systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 2011;49:665-70. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01602-10>
14. **Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, Salomoni MA, Hao B, Press EG, et al.** Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction,  $\beta$ -D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2012;54:1240-8. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis200>
15. **Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, Nguyen PN, Thomas C.** Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:11141-56. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/16.23.11141>
16. **García LT, Cristancho LM, Vera EP, Begambre O.** A new multiplex-PCR for urinary tract pathogens detection using primer design based on an evolutionary computation method. *J Microbiol Biotechnol*. 2015;25:1714-27. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1406.06079>
17. **Allawi HT, Santa Lucia J Jr.** Thermodynamics and NMR of internal G.T mismatches in ADN. *Biochemistry*. 1997;36:10581-94. <http://dx.doi.org/10.1021/bi962590c>
18. **Dieffenbach CW, Dveksler GS.** PCR primer: A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor: Laboratory Press; 1994. p. 61-74.
19. **Trost A, Graf B, Eucker J, Sezer O, Possinger K, Göbel UB, et al.** Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. *J Microbiol Methods*. 2004;56:201-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2003.10.007>
20. **Carvalho A, Costa-De-Oliveira S, Martins ML, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Ludovico P, et al.** Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Med Mycol*. 2007;45:619-27. <http://dx.doi.org/10.1080/13693780701501787>
21. **Luo G, Mitchell TG.** Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2860-5. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.8.2860-2865.2002>
22. **Taira CL, Okay TS, Delgado AF, Ceccon ME, de Almeida MT, Del Negro GM.** A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically ill paediatric patients. *BMC Infect Dis*. 2014;14:406. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-14-406>
23. **Bougnoux ME, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D, et al.** Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol*. 1999;37:925-30.
24. **Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA.** British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect Dis*. 2003;3:230-40. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00580-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00580-2)
25. **Zuluaga A, De Bedout C, Agudelo CA, Hurtado H, Arango M, Restrepo A, et al.** Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de *Candida* aisladas de pacientes provenientes de unidades de cuidados intensivos en Medellín, Colombia (2001-2007). *Rev Iberoam Micol*. 2010;27:125-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2010.04.001>
26. **García-Effron G, Katiyar SK, Park S, Edlind TD, Perlin DS.** A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:2305-12. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00262-08>
27. **Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S.** The epidemiology of hematogenous candidiasis by different *Candida* species. *Clin Infect Dis*. 1997;24:1122-8. <http://dx.doi.org/10.1086/513663>

28. **Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, et al.** Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population based active surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1519-27. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.4.1519-1527.2004>
29. **Eggimann P, Garbino J, Pittet D.** Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:685-702. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00801-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00801-6)
30. **Krcmery VJ, Kovacicova G.** Longitudinal 10-year prospective survey of fungaemia in Slovak Republic: Trends in etiology in 310 episodes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000;36:7-11. [http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(99\)00096-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(99)00096-6)
31. **Wingard JR.** Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis.* 1995;20:115-25. <http://dx.doi.org/10.1093/clinids/20.1.115>
32. **Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, et al.** Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: Results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1829-35. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.4.1829-1835.2005>
33. **Viudes A, Peman J, Canton E, Úbeda P, López-Ribot JL, Gobernado M.** Candidemia at a tertiary-care hospital: Epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21:767-74. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-002-0822-1>
34. **Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, et al.** A prospective observational study of candidemia: Epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis.* 2003;37:634-43. <http://dx.doi.org/10.1086/376906>
35. **Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R.** *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg.* 1994;220:751-58.
36. **Hoppe JE, Frey P.** Evaluation of six commercial tests and the germ-tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999;18:188-91. <http://dx.doi.org/10.1007/s100960050256>
37. **Zilberberg MD, Kollef MH, Arnold H, Labelle A, Micek ST, Kothari S, et al.** Inappropriate empiric antifungal therapy for candidemia in the ICU and hospital resource utilization: A retrospective cohort study. *BMC Infect Dis.* 2010;10:150. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-10-150>
38. **Pfaller MA, Diekema DJ.** Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:133-63. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00029-06>
39. **Pillet S, Lardeux M, Dina J, Grattard F, Verhoeven P, Le Goff J, et al.** Comparative evaluation of six commercialized multiplex PCR kits for the diagnosis of respiratory infections. *PLoS One.* 2013;8:e72174. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072174>
40. **Lass-Flörl C, Mutschlechner W, Aigner M, Grif K, Marth C, Girschikofsky M, et al.** Utility of PCR in diagnosis of invasive fungal infections: Real-life data from a multicenter study. *J Clin Microbiol.* 2013;51:863-8. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02965-12>
41. **Fournier PE, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, Raoult D.** Modern clinical microbiology: New challenges and solutions. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:574-85. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3068>

ARTÍCULO ORIGINAL

## Diversidad genética de cepas extraintestinales de *Escherichia coli* productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención en salud

Yasmin Varela<sup>1,2</sup>, Beatriz Millán<sup>1\*</sup>, María Araque<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

<sup>2</sup> Posgrado de Microbiología Clínica, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

**Introducción.** En Venezuela existen pocos reportes que describan las bases genéticas del potencial patogénico y filogenético de las cepas de *Escherichia coli* provenientes de hospitales.

**Objetivo.** Determinar la diversidad genética de cepas extraintestinales de *E. coli* productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención de salud.

**Materiales y métodos.** Se estudió una colección de 12 cepas extraintestinales de *E. coli* con sensibilidad disminuida a las cefalosporinas de amplio espectro. La sensibilidad antimicrobiana se determinó por concentración inhibitoria mínima. La detección de los grupos filogenéticos, de los factores de virulencia y de los genes que codifican la resistencia antimicrobiana se hizo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y la relación clonal se estableció mediante reacción en cadena de la polimerasa de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (*Repetitive Element Palindromic-PCR*, rep-PCR).

**Resultados.** Todas las cepas analizadas presentaron resistencia a las cefalosporinas, y resistencia conjunta a quinolonas y aminoglucósidos. La distribución filogenética evidenció que los grupos A y B1 fueron los más frecuentes, seguidos por D y B2; en este último, se detectaron todos los factores de virulencia evaluados, y el gen más frecuente fue el *fimH*. En todas las cepas analizadas, se encontró *bla*<sub>CTX-M</sub><sup>1</sup>, con predominio de las *bla*<sub>CTX-M-8</sub><sup>1</sup> y en dos de estas cepas se evidenció la presencia simultánea de *bla*<sub>CTX-M-9</sub><sup>1</sup>, variantes *bla*<sub>CTX-M-65</sub> y *bla*<sub>CTX-M-147</sub><sup>1</sup>.

**Conclusión.** Las cepas estudiadas demostraron diversidad genética y albergaron diferentes genes de virulencia y betalactamasas de espectro extendido (BLEE) sin predominio de ningún filogeno en particular. Este estudio constituye el primer reporte de la variante *bla*<sub>CTX-M-65</sub> en Venezuela y de la variante *bla*<sub>CTX-M-147</sub> en el mundo, en cepas no relacionadas genéticamente aisladas de hospitales, situación que merece atención y la racionalización del uso de los antimicrobianos.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*; infección hospitalaria; betalactamasas; filogenia; reacción en cadena de la polimerasa.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3324>

### Genetic diversity of extraintestinal *Escherichia coli* strains producers of beta-lactamases TEM, SHV and CTX-M associated with healthcare

**Introduction:** There are few reports from Venezuela describing the genetic basis that sustains the pathogenic potential and phylogenetics of *Escherichia coli* extraintestinal strains isolated in health care units.

**Objective:** To establish the genetic diversity of extraintestinal *E. coli* strains producers of beta-lactamases TEM, SHV and CTX-M associated with healthcare.

**Materials and methods:** We studied a collection of 12 strains of extraintestinal *E. coli* with diminished sensitivity to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrobial susceptibility was determined by minimum inhibitory concentration. We determined the phylogenetic groups, virulence factors and genes encoding antimicrobial resistance using PCR, and clonal characterization by repetitive element palindromic-PCR rep-PCR.

**Results:** All strains showed resistance to cephalosporins and joint resistance to quinolones and aminoglycosides. The phylogenetic distribution showed that the A and B1 groups were the most frequent, followed by D and B2. We found all the virulence factors analyzed in the B2 group, and *fimH*

#### Contribución de los autores:

Yasmin Varela y Beatriz Millán: caracterización fenotípica y molecular de las cepas estudiadas, análisis bioinformático

María Araque: diseño del estudio y discusión crítica

Todas las autoras participaron en la escritura del manuscrito.

gene was the most frequent among them. We found *bla*<sub>CTX-M</sub> in all strains, with a higher prevalence of *bla*<sub>CTX-M-9</sub>; two of these strains showed coproduction of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> and were genetically identified as *bla*<sub>CTX-M-65</sub> and *bla*<sub>CTX-M-147</sub> by sequencing.

**Conclusion:** The strains under study showed genetic diversity, hosting a variety of virulence genes, as well as antimicrobial resistance with no particular phylogroup prevalence. This is the first report of *bla*<sub>CTX-M</sub> alleles in Venezuela and in the world associated to non-genetically related strains isolated in health care units, a situation that deserves attention, as well as the rationalization of antimicrobials use.

**Key words:** *Escherichia coli*; cross infection; beta-lactamases; phylogeny; clonal diversity; polymerase chain reaction.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3324>

*Escherichia coli* constituye parte de la microbiota habitual del intestino de muchos animales, incluidos los humanos. Según su relación con el huésped se agrupa en cepas comensales, patotipos intestinales y patógenas extraintestinales (*Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli*, ExPEC) (1). Este último grupo es la causa principal de infecciones urinarias, abdominales y de tejidos blandos, así como de meningitis, neumonía, bacteriemias y osteomielitis (2).

Las cepas de *E. coli* son genéticamente diversas y las diferencias entre las patógenas y las comensales se fundamentan en sus antecedentes filogenéticos, con base en los cuales se clasifican en cuatro grupos principales: A, B1, B2 y D (3). Las cepas A y B1 se consideran de bajo poder virulento, en tanto que las patógenas extraintestinales albergan genes que codifican factores de virulencia responsables de promover las etapas de colonización, adherencia, invasión y evasión de los mecanismos de defensa del huésped humano, y pertenecen principalmente a los filogrupos B2 y D (1,4,5).

Tradicionalmente, los antibióticos betalactámicos se han utilizado para el tratamiento de las infecciones producidas por *E. coli*. Sin embargo, en los últimos años su efectividad se ha visto amenazada por el incremento en la prevalencia de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (6). La mayoría de las BLEE producidas por miembros de la familia Enterobacteriaceae son variantes alélicas de las conocidas betalactamasas TEM y SHV (7), pero desde los años 90, otras

enzimas identificadas como CTX-M de la clase A de Ambler, se han diseminado rápidamente en todo el mundo (6).

La relación entre los genes que median la resistencia antimicrobiana, los grupos filogenéticos y la presencia de factores determinantes de virulencia como indicadores de patogenicidad es controversial (2,8). No obstante, Lee, *et al.* (9), encontraron una estrecha relación entre los genes involucrados en el transporte del hierro (*iutA*), la supervivencia en el suero (*traT*) y la presencia de CTX-M-1 y CTX-M-9 en aislamientos de *E. coli* extraintestinales del grupo B2.

En este contexto, recientemente se reportó por primera vez en Latinoamérica la presencia de cepas de *E. coli* uropatógenas productoras de CTX-M-15, filogrupo B2, provenientes de la comunidad, que portaban por lo menos cinco genes asociados a virulencia (*fimH*, *kpsMTII*, *papAH*, *fyuA* y *usp*), así como islas de patogenicidad (10). La diseminación mundial de la CTXM-15 y de clones patógenos, como el tipo ST131, parece responder a una eficiente plataforma genética de transferencia horizontal de genes de resistencia y virulencia mediante la inserción de secuencias genéticas específicas, transposones y plásmidos (11).

Las técnicas de genotipificación se han convertido en herramientas valiosas para el análisis de bacterias, especialmente, las involucradas en infecciones hospitalarias. Entre dichas técnicas se encuentra la amplificación de elementos repetitivos palindrómicos por PCR (*repetitive element palindromic-PCR*, rep-PCR), la cual tiene una gran capacidad de discriminación y puede emplearse para la detección rápida de la diversidad y la evolución de los genomas bacterianos (12).

En Venezuela son pocos los reportes que describen las bases genéticas que sustentan el potencial patológico de los grupos filogenéticos y la relación clonal de *E. coli* extraintestinales (ExEC) productoras de BLEE asociadas a la atención en salud (13).

Correspondencia:

Beatriz Millán, Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Sector Campo de Oro, Mérida 5101, Venezuela  
Telefax: (58) (274) 266 7601  
bmillanm@ula.ve

Recibido: 23/04/16; aceptado: 23/08/16

En este sentido, en el presente estudio se determinó la diversidad genética de cepas aisladas de pacientes recluidos en el Servicio de Medicina Interna del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA) de Mérida, Venezuela.

## Materiales y métodos

### Cepas bacterianas

Se estudió una colección de 12 cepas extraintestinales de *E. coli* con sensibilidad disminuida a las cefalosporinas de amplio espectro, provenientes de aislamientos de adultos hospitalizados en el Servicio de Medicina Interna del IAHULA con infección asociada a la atención en salud, de marzo a julio de 2013.

La edad promedio de los pacientes incluidos en el estudio fue de 39,25 años (rango de 20 a 82) y la distribución de las cepas aisladas fue igual para ambos sexos. En cuatro casos, se diagnosticó neumonía adquirida en el hospital, en tres, infecciones de heridas no quirúrgicas, en dos, infección de las vías urinarias, y en cada uno de los tres casos restantes, sepsis, absceso e infección de la herida quirúrgica, respectivamente. Los aislamientos habían sido caracterizados parcialmente en un estudio previo (14).

### Prueba de sensibilidad antimicrobiana

La sensibilidad antimicrobiana se determinó con la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante el método de dilución en agar, según lo establecido por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (15). Los antibióticos probados fueron cefotaxima, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, aztreonam, imipenem, ertapenem, meropenem, gentamicina, tobramicina, amikacina, ácido nalidíxico y ciprofloxacino.

Se hizo el estudio fenotípico de todas las cepas para determinar la presencia de BLEE mediante la prueba de sinergia de doble disco, según lo establecido por el CLSI (15).

### Preparación del ADN genómico

El ADN total se extrajo mezclando varias colonias provenientes de cultivos frescos en 200 µl de agua destilada estéril. Estas suspensiones se congelaron a -20 °C durante 30 minutos y luego se sometieron a ebullición durante 15 minutos. Los residuos celulares se separaron por centrifugación (13.000 rpm durante cinco minutos a temperatura ambiente) y el ADN disuelto en el sobrenadante se recuperó en un tubo Eppendorf estéril, el cual se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.

### Detección de los grupos filogenéticos

Los aislamientos se clasificaron en los filogrupos A, B1, B2 y D con base en la presencia de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento génico TspE4.C2, mediante amplificación por PCR en las condiciones previamente establecidas (16) y utilizando los iniciadores descritos en el cuadro 1.

Los resultados se interpretaron con base en el esquema de Clermont, *et al.* (4), estableciendo la ausencia (-) o presencia (+) de los elementos ya mencionados, así: grupo A: *chuA*(-) y TspE4.C2 (-); B1: *chuA*(-) y TspE4.C2 (+); B2: *chuA*(+) y *yjaA* (+), y D: *chuA*(+) y *yjaA* (-). En estos ensayos se utilizaron como cepas de control *E. coli* LMM36-ULA (*chuA*+ y *yjaA* +) y *E. coli* LMM32-ULA (TspE4.C2 +).

### Detección y secuenciación de los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>

En la detección de los genes codificantes para TEM, SHV y CTX-M en las cepas estudiadas, se utilizaron los iniciadores señalados en el cuadro 1 y las condiciones de amplificación descritas en estudios previos (17-20).

En los ensayos se utilizaron las siguientes cepas de control: *Klebsiella pneumoniae* AMKP135-ULA (TEM-1 y SHV-5), *K. pneumoniae* LMM28-ULA (CTX-M-1), *K. pneumoniae* LMM29-ULA (CTX-M-2), *K. pneumoniae* Kpn206-ULA (CTX-M-8) y *Citrobacter freundii* LMM07/10-ULA (CTX-M-9).

Los amplicones se purificaron utilizando el sistema PCR-Accuprep (Bioneer) y se secuenciaron utilizando los servicios de Macrogen, Inc. (Seúl, Corea) mediante electroforesis capilar en un secuenciador modelo ABI3730XL (Applied Biosystems, CA, USA), con los mismos iniciadores usados en la reacción de PCR. Las secuencias de nucleótidos resultantes se analizaron con el programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y se compararon con las secuencias genéticas incluidas en las bases de datos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### Detección de genes de virulencia

Se estudiaron seis genes de virulencia: la cápsula polisacárida específica del grupo II (*kpsMTII*), la adhesina de la fimbria de tipo 1 (*fimH*), la fimbria P (*papAH*), el marcador de isla de patogenia, la yersiniabactina (sideróforo *fyuA*) y la proteína específica uropatógena (*usp*). Los genes *kpsMTII* y *fimH* y la isla de patogenia se detectaron mediante una PCR múltiple y, el resto de genes estudiados mediante PCR simple, utilizando los iniciadores

**Cuadro 1.** Iniciadores utilizados en este estudio

Gen	Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Referencia
<i>chuA</i>	Fw- <i>chuA</i> Rv- <i>chuA</i>	GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA	(4)
<i>yjaA</i>	Fw- <i>yjaA</i> Rv- <i>yjaA</i>	TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC	(4)
TspE4.C2	Fw-TspE4C2 Rv-TspE4C2	GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG	(4)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	Fw- <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> Rv- <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC CCG CTG CCG GTY TTA TCV CCB AC	(17)
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	Fw- <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> Rv- <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	ATG GTT AAA AAA TCA CTG C GGT GAC GAT TTT AGC CGC	(18)
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	Fw- <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> Rv- <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	TTA ATG ATG ACT CAG AGC ATT C GAT ACC TCG CTC CAT TTA TTG C	(19)
<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>	Fw- <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> Rv- <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>	TGA ATA CTT CAG CCA CAC G TAG AAT TAA TAA CCG TCG GT	(17)
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	Fw- <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> Rv- <i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	AAC ACG GAT TGA CCG TCT TG TTA CAG CCC TTC GGC GAT	(17)
<i>bla</i> <sub>CTX-M-25</sub>	Fw- <i>bla</i> <sub>CTX-M-25</sub> Rv- <i>bla</i> <sub>CTX-M-25</sub>	CGC CGA TAA CAC GCA GAC CGG CTC CGA CTG GGT GAA GTA	(17)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	Fw- <i>bla</i> <sub>SHV</sub> Rv- <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC TTA GCG TTG CCA GTG CTC	(20)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	Fw- <i>bla</i> <sub>TEM</sub> Rv- <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC A	(20)
<i>kpsMTII</i>	Fw- <i>kpsMTII</i> Rv- <i>kpsMTII</i>	GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG CATC CAG ACG ATA AGC ATG AGC A	(21)
<i>fimH</i>	Fw- <i>fimH</i> Rv- <i>fimH</i>	TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA	(21)
PAI	Fw-PAI Rv-PAI	GGA CAT CCT GTT ACA GCG CGC A TCG CCA CCA ATCA CAG CCG AAC	(21)
<i>papAH</i>	Fw- <i>papAH</i> Rv- <i>papAH</i>	ATG GCA GTG GTG TCT TTT GGT G CGT CCC ACC ATA CGT GCT CTT C	(21)
<i>fyuA</i>	Fw- <i>fyuA</i> Rv- <i>fyuA</i>	TGA TTA ACC CCG CGA CGG GAA CGC AGT AGG CAC GAT GTT GTA	(21)
<i>usp</i>	Fw- <i>usp</i> Rv- <i>usp</i>	ATG CTA CTG TTT CCG GGT AGT GTG T CAT CAT GTA GTC GGG GCG TAA CAA T	(22)
	FwREP-PCR RvREP-PCR	IIIG CGC CGI CAT CAG GC ACG TCT TAT CAG GCC TAC	(23)

señalados en el cuadro 1 y las condiciones de amplificación previamente establecidas (16). Las cepas de control utilizadas en estos ensayos fueron *E. coli* LMM/E02-ULA (*fimH*+, *fyuA*+, *kpsMTII* + y PAI +), *E. coli* LMM/Sc03-ULA (*papAH*+) y *E. coli* LMM/E02-ULA (*usp*+).

#### Relación clonal de *E. coli* mediante rep-PCR

La relación clonal de esta colección de cepas se determinó mediante la amplificación de secuencias repetitivas por PCR (rep-PCR) a partir del ADN total, utilizando los iniciadores señalados en el cuadro 1 y las condiciones previamente descritas (23). La mezcla de reacción se hizo en un volumen final de 25 µl. Los patrones obtenidos en la rep-PCR se analizaron con el programa TREECON 1.3b, el cual generó el dendrograma, o árbol de similitud, para establecer las relaciones entre las cepas estudiadas. Los patrones con coeficientes de similitud superiores a 90 % se consideraron relacionados a nivel clonal.

Todos los ensayos de PCR se hicieron en un termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400®, USA), los productos amplificados se separaron en geles de agarosa (Sigma-Aldrich Co.®, St. Louis, MO, USA) al 1 %, se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/ml; Sigma-Aldrich) y se fotografiaron con un equipo UVP Biodoc-ItSystem®, USA. Como marcadores de peso molecular se utilizaron escaleras de 50 y 100 pb (Bioneer).

#### Resultados

Las aislamientos evaluados en este estudio, provenientes de pacientes con infecciones asociadas a la atención en salud, fueron resistentes a las cefalosporinas de amplio espectro en rangos que oscilaron entre 4 y >128 µg/ml. Nueve (75 %) de las 12 cepas demostraron sensibilidad a piperazilina-tazobactam, con una CIM entre 2 y 16 µg/ml, mientras que el 100 % fue sensible a los carbapenémicos (CIM: 0,008-0,125 µg/ml). Estos resultados y los obtenidos al utilizar la prueba

SDS evidenciaron que las cepas estudiadas eran productoras de BLEE. Por otra parte, ocho (66,6 %) de las 12 cepas presentaron resistencia conjunta a las quinolonas y los aminoglucósidos, y en el resto (4/12; 33,3 %) se encontró una disminución de la sensibilidad a un solo grupo de estos antibióticos (cuadro 2).

Las características genéticas de las cepas ExEC se muestran en la figura 1. Cuatro de las cepas pertenecían a los grupos A (33,3%) y B1 (33,3 %), tres al D (25 %) y una al B2 (8,3 %). En relación con la distribución del número y el tipo de betalactamasas, se pudo observar que el gen *bla*<sub>CTX-M</sub> fue el más frecuente al detectarse en todas las cepas estudiadas; la CTX-M-8 fue la variante más común, seguida por CTX-M-15 y CTX-M-2. La presencia asociada de, por lo menos, dos

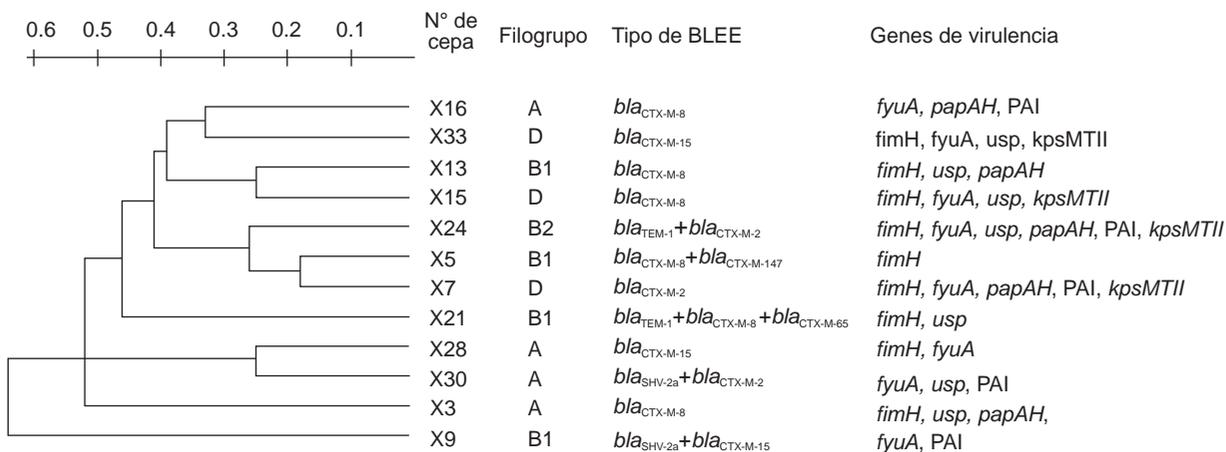
tipos de betalactamasas se demostró en cinco cepas, de las cuales tres pertenecían al filogrupa B1 y, las dos restantes, a los grupos A y B2, respectivamente. Dos de las cepas pertenecientes al filogrupa B1 eran productoras de CTX-M-9 y de CTX-M-8, y una de ellas se asoció, además, a una betalactamasa del tipo TEM-1. Mediante el análisis de la secuencia genética de estas cepas, se determinó la presencia de dos alelos de CTX-M-9: *bla*<sub>CTX-M-65</sub>, con un porcentaje de identidad de 98 % con el patrón de referencia KC121030.1 (GenBank), y *bla*<sub>CTX-M-147</sub>, con un 83 % de identidad con el patrón KF513180.1 (GenBank).

En dos cepas pertenecientes a los filogrupos A y B1, se observó la producción de SHV-2a y de *bla*<sub>CTX-M</sub>; en ambos grupos filogenéticos, esta BLEE se asoció específicamente con la CTX-M-2 y la

**Cuadro 2.** Perfil de sensibilidad antimicrobiana de cepas ExEC productoras de betalactamasas

Número de cepa	CIM (µg/ml)								Resistencia asociada a otros antibióticos
	PIP/TZ	CTX	CAZ	AZT	ERT	IMP	MER	PSDD	
X3	8	8	8	32	0,016	0,125	0,064	+	ACN, CIP, GEN
X5	2	32	32	32	0,016	0,125	0,064	+	ACN, GEN
X7	4	16	16	32	0,016	0,125	0,125	+	ACN
X9	32	32	32	> 64	0,032	0,025	0,032	+	ACN, GEN, TOB
X13	4	16	16	32	0,064	0,125	0,064	+	ACN, CIP, GEN, TOB
X15	16	128	8	64	0,016	0,064	0,032	+	ACN, CIP, GEN, TOB
X16	32	> 128	64	64	0,008	0,064	0,125	+	ACN, CIP, GEN, TOB
X21	4	128	8	32	0,064	0,064	0,064	+	GEN
X24	2	4	8	16	0,008	0,032	0,032	+	ACN, CIP, GEN, TOB
X28	> 32	> 128	64	> 64	0,008	0,032	0,032	+	ACN, CIP, GEN
X30	16	> 128	32	> 64	0,064	0,125	0,064	+	ACN, CIP
X33	8	64	16	> 64	0,064	0,064	0,064	+	ACN, CIP

CIM: concentración inhibitoria mínima; PIP/TZ: piperacilina-tazobactam; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; AZT: aztreonam; ERT: ertapenem; IMP: imipenem; MER: meropenem; ACN: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacina; AMK: amikacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; PSDD: prueba de sinergia de doble disco



**Figura 1.** Dendrograma de los patrones obtenidos mediante rep-PCR que muestran la diversidad clonal y las características genéticas de las cepas ExEC

CTX-M-15, respectivamente. En cuanto a los factores determinantes de virulencia, 11 (91,7 %) de las 12 cepas presentaron, por lo menos, dos de los seis genes estudiados, y el *fimH* (9/12; 75 %) fue el más frecuente. No obstante, el *kpsMTII* solo se detectó en las cepas pertenecientes a los filogrupos B2 y D. Independientemente del filogrupo y del perfil de betalactamasas, los genes de virulencia se distribuyeron en distintos patrones; es de resaltar que en la única cepa del grupo B2 se expresaron los seis genes en estudio. Esta cepa y las que conformaron el filogrupo D, albergaron el mayor número de los factores determinantes de patogenia analizados en este trabajo.

La relación clonal establecida mediante rep-PCR permitió demostrar que más de la mitad de las cepas estudiadas se distribuyeron en tres grupos principales, aproximadamente, con 72 % de similitud (figura 1), aunque se destacó un subgrupo conformado por dos cepas (LMM-X5 y LMM-X7) con una relación cercana al 82 %. Las cepas con relaciones distantes no superaron un índice de similitud de 40 %. La distribución clonal fue diversa e independiente de las características fenotípicas y genéticas de cada cepa.

## Discusión

En este trabajo se demostró que el 100 % de las cepas analizadas provenientes de hospitales eran resistentes a las cefalosporinas de amplio espectro y a los monobactámicos. Este perfil fenotípico era congruente con la detección de varios genes de BLEE, como el *bla*<sub>TEM</sub>, el *bla*<sub>SHV</sub> y el *bla*<sub>CTX-M</sub>, y, además, en el análisis fenotípico todas las cepas demostraron resistencia a otros grupos de antimicrobianos, como los aminoglucósidos y las quinolonas. Guzmán, *et al.* (24), obtuvieron resultados similares a partir de aislamientos de enterobacterias de pacientes con infecciones asociadas a la atención en salud en el Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" de Cumaná en Venezuela, ya que se encontraron los genes *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>SHV-1</sub>, *bla*<sub>SHV-5</sub>, *bla*<sub>SHV-5-2a</sub> y *bla*<sub>CTX-M-1</sub>. Por otra parte, en otros estudios se ha reportado el aislamiento de *E. coli* productoras de BLEE en heces de niños asintomáticos residentes en zonas urbanas de Bolivia, lo cual demuestra la amplia diseminación de ExEC portadora de genes BLEE en la comunidad (25).

El empleo de técnicas moleculares ha permitido la caracterización de las diferentes betalactamasas, así como determinar su distribución y sus variantes alélicas. Se han reportado seis grupos principales en la CTX-M: *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>,

*bla*<sub>CTX-M-25</sub> y *bla*<sub>CTX-M-45</sub>; *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ha sido el de mayor diseminación, con un comportamiento pandémico. En los últimos años, se ha reportado en Argentina, Bolivia, Colombia, Perú y Venezuela (24-29) la presencia de otras variantes: *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub> y *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (variante *bla*<sub>CTX-M-65</sub>), además de la asociación con *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub>, y la resistencia simultánea a otros grupos de antimicrobianos en aislamientos provenientes de hospitales y de la comunidad (8-9,30). Dichos hallazgos coinciden con los de la presente investigación, en la cual se evidenció un predominio de aislamientos productores de *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, a pesar del número reducido de cepas no relacionadas a nivel clonal que se analizaron.

Es importante destacar que en este estudio se detectaron dos variantes alélicas infrecuentes, la *bla*<sub>CTX-M-65</sub> y la *bla*<sub>CTX-M-147</sub>, asociadas a otras BLEE. No hay descripciones de *bla*<sub>CTX-M-147</sub> a nivel clínico o veterinario, y solo se conoce el registro de la secuencia genética en el Genbank (KF513180.1), en tanto que la *bla*<sub>CTX-M-65</sub> se ha reportado en China en aislamientos provenientes de heces de animales sanos de granja y de mascotas, así como en muestras humanas (31-33). La primera descripción de *bla*<sub>CTX-M-65</sub> en Suramérica se hizo en Bolivia en el 2012, a partir de hisopados rectales de niños sanos (25).

En cuanto a los grupos filogenéticos, los grupos A y B1 fueron los más frecuentes seguidos por el grupo D y, en menor proporción, el B2. Estos resultados difieren de los datos reportados en diversos países, donde el filogrupo B2 se ha reportado como el más prevalente en infecciones asociadas a la atención en salud (34-39).

A pesar de que los grupos A y B1 se caracterizan por la presencia de pocos genes de virulencia, dicha condición no constituye un impedimento para la producción de infecciones extraintestinales (5,21,40); de hecho, los factores que median la adhesión bacteriana y los sistemas de captación de hierro (*fimH* y *fyuA*), se han detectado en todos los grupos filogenéticos investigados, lo que evidencia el papel fundamental que desempeñan estos genes en la colonización, la supervivencia, el desarrollo y la instauración de un proceso infeccioso (41-43).

La relación de los genes que median la resistencia a los betalactámicos y la carga conjunta de factores de virulencia no demostraron ser específicas de un filogrupo en particular, lo cual coincide con lo descrito por Yun, *et al.* (44). Por el contrario,

Johnson, *et al.* (21), determinaron la existencia de una relación inversamente proporcional entre el número de factores de virulencia y la presencia de genes de resistencia en cepas de *E. coli* de filogrupos diferentes. Es probable que la coexistencia de factores determinantes de virulencia y de mecanismos de resistencia en cepas de *E. coli* sea el resultado de un proceso de evolución gradual concertada; además, la asociación de estas características depende del nicho ecológico, la presión selectiva del ambiente, las características bacterianas en diferentes regiones geográficas y de la reacción del sistema inmunitario del huésped sensible (2,8,44).

Los resultados permiten concluir que, en las diferentes áreas del Servicio de Medicina Interna del IAHULA, circulan cepas de *E. coli* extraintestinales con una diversidad genética amplia y sin relación clonal estrecha. Esta característica se evidenció por la presencia de todos los filogrupos en los aislamientos de *E. coli* estudiados, en los cuales se expresaban diversos factores de virulencia y factores determinantes de resistencia antimicrobiana.

Es importante destacar, además, que en este trabajo se describen por primera vez variantes alélicas emergentes de BLEE del tipo CTX-M desconocidas en Venezuela, la *bla*<sub>CTX-M-65</sub> y la *bla*<sub>CTX-M-147</sub>.

Estos hallazgos indican que es imperativo mantener las medidas básicas de higiene, asepsia y antisepsia, con el fin de evitar la transmisión horizontal de microorganismos potencialmente patógenos, así como implementar programas de vigilancia epidemiológica que permitan racionalizar el uso de los antimicrobianos de amplio espectro, y reforzar los protocolos para prevenir y controlar las infecciones asociadas a la atención en salud.

### Conflicto de intereses

Las autoras declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Financiación

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela (CDCHTA-ULA), códigos: ADG FA-02-97-07 y FA-554-14-03EM.

### Referencias

1. **Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U.** *E. coli* as an all-rounder: The thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;358:3-32. [http://dx.doi.org/10.1007/82\\_2012\\_303](http://dx.doi.org/10.1007/82_2012_303)
2. **Pitout JD.** Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. *Front Microbiol.* 2012;3:1-7. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00009>
3. **Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S, Hall RM.** Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: A reservoir for antibiotic-resistance determinants. *J Med Microbiol.* 2010;59:1331-9. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.022475-0>
4. **Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E.** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:4555-8. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>
5. **Moreno E, Prats I, Planells I, Planes A, Pérez T, Andreu A.** Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;28:483-9. <http://dx.doi.org/10.1157/13092463>
6. **Cantón R, González JM, Galán JC.** CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Front Microbiol.* 2012;3:1-19. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>
7. **Bush K, Jacoby GA.** Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:969-76. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
8. **Beceiro A, Tomas M, Bou G.** Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:185-230. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00059-12>
9. **Lee S, Yu JK, Park K, Oh EJ, Kim SY, Park YJ.** Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of *Escherichia coli* and their association with *bla* CTX-M. *Ann Clin Lab Sci.* 2010;40:361-7.
10. **Millán Y, Hernández E, Millán B, Araque M.** Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Rev Argent Microbiol.* 2014;46:175-81. [http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70069-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70069-0)
11. **Nicolás MH, Blanco J, Leflon V, Demarty R, Alonso M, Canica M, et al.** Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:273-81. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm464>
12. **Guillén L, Millán B, Araque M.** Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Infectio.* 2014;18:100-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.004>
13. **Araque M, Millán B, Mendoza E, Salas M.** CTX-M-32 beta-lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated in Latin America. *J Infect Dev Ctries.* 2013;7:432-35. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.3488>
14. **Abreu S, Varela Y, Millán B, Araque M.** *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de beta-lactamasas de espectro extenso aisladas en pacientes con infección asociada a los cuidados de la salud en un hospital universitario. *Enf Inf Microbiol.* 2014;34:92-9.
15. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test; 26th informational supplement. Wayne: CLSI; 2016.

16. **Millán Y.** Genotipificación y distribución de los grupos filogenéticos y factores de virulencia en *Escherichia coli* uropatógena productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extenso (tesis). Mérida: Universidad de Los Andes; 2013.
17. **Ma L, Chang FY, Fung CP, Chen TL, Lin JC, Lu PL, et al.** Variety of TEM-, SHV-, and CTX-M-type  $\beta$ -lactamases present in recent clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* from Taiwan. *Microb Drug Resist.* 2005;11:31-9. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2005.11.31>
18. **Eckert C, Gautier V, Arlet G.** DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:14-23. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki398>
19. **Di Conza J, Ayala JA, Power P, Mollerach M, Gutkind G.** Novel class 1 integron (InS21) carrying *bla*<sub>CTX-M-2</sub> in *Salmonella enteric* serovar infantis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2257-61. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.7.2257-2261.2002>
20. **Chang FY, Siu LK, Fung CP, Huang MH, Ho M.** Diversity of SHV and TEM  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: Gene evolution in Northern Taiwan and two novel  $\beta$ -Lactamases, SHV-25 and SHV-26. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:2407-13. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.9.2407-2413.2001>
21. **Johnson JR, Stell AL.** Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis.* 2000;181:261-72. <http://dx.doi.org/10.1086/315217>
22. **Nakano M, Yamamoto S, Terai A, Ogawa O, Makino S, Hayashi H, et al.** Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;205:71-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10927.x>
23. **Lozano DM, Cisneros JM, Becerril B, Cuberos L, Prados T, Ortiz CL, et al.** Comparison of a repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR method and clinical and microbiological methods for determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4571-5. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.12.4571-4575.2002>
24. **Guzmán M, Rodríguez E, Antón K, Silva S, Navarro J, Lastra E, et al.** Genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> en enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria. *Invest Clin.* 2013;54:235-45.
25. **Bartoloni A, Pallecchi L, Riccobono E, Matella A, Magnelli E, Di Maggio T, et al.** Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded spectrum cephalosporins in *Escherichia coli*: 20 years of surveillance in resource-limited settings from Latin America. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:356-61. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03807.x>
26. **Guzmán M, Labarca J, Villegas M, Gotuzzo E.** On behalf of the Latin America Working Group on Bacterial Resistance. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *Braz J Infect Dis.* 2014;18:421-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.10.005>
27. **Gaitán S, Espinal P, Grupo de Investigación en Resistencia Bacteriana Región Caribe.** Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. *Rev Chil Infectol.* 2009;26:239-46. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182009000400006>
28. **Hernández E, Araque M, Millán Y, Millán B, Vielma S.** Prevalencia de  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 en grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena aisladas en pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Invest Clin.* 2014;55:32-43.
29. **Torres L, Benítez M, Domínguez M, Torres O, Gagliotta V, Calvo A, et al.** Detección de integrones clase I en cepas de enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro expandido tipo SHV y CTX-M grupo-2. *Vitae.* 2005;1:1-16.
30. **Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, et al.** Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:2720-25. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00026-07>
31. **He L, Partridge SR, Yang X, Hou J, Deng Y, Yao Q, et al.** Complete nucleotide sequence of pHN7A8, an F33:A-B-type epidemic plasmid carrying *bla*<sub>CTX-M-65</sub>, *fosA3* and *rmtB* from China. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:46-50. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks369>
32. **Xia S, Fan X, Huang Z, Xia L, Xiao M, Chen R, et al.** Dominance of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset and hospital-onset infection in China. *PLoS ONE.* 2014;9:1-7. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0100707>
33. **Yin J, Cheng J, Sun Z, Ye Y, Gao YF, Li L, et al.** Characterization of two plasmid-encoded cefotaximases found in clinical *Escherichia coli* isolates: CTX-M-65 and a novel enzyme, CTX-M-87. *J Med Microbiol.* 2009;58:811-5. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.006007-0>
34. **Da Silva G, Mendonça N.** Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence.* 2012;3:18-28. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.3.1.18382>
35. **Cooke N, Smith S, Kelleher M, Rogers T.** Major differences exist in frequencies of virulence factors and multidrug resistance between community and nosocomial *Escherichia coli* bloodstream isolates. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1099-104. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02017-09>
36. **Santos A, Zidko A, Pignatari A, Silva R.** Assessing the diversity of the virulence potential of *Escherichia coli* isolated from bacteremia in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2013;46:968-73. <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20133184>
37. **Alizade H, Ghanbarpour R, Afatoonian MR.** Virulence genotyping of *Escherichia coli* isolates from diarrheic and urinary tract infections in relation to phylogeny in southeast of Iran. *Trop Biomed.* 2014;31:174-82.
38. **Bukh AS, Schønheyder HC, Emmersen JM, Søgaard M, Bastholm S, Roslev P.** *Escherichia coli* phylogenetic groups are associated with site of infection and level of antibiotic resistance in community-acquired bacteraemia: A 10 year population-based study in Denmark. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:163-8. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp156>

39. **Bert F, Johnson JR, Ouattara B, Leflon V, Johnston B, Marcon E, et al.** Genetic diversity and virulence profiles of *Escherichia coli* isolates causing spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in patients with cirrhosis. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2709-14. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00516-10>
40. **Kudinha T, Johnson JR, Andrew SD, Kong F, Anderson P, Gilbert GL.** Distribution of phylogenetic groups, sequence type ST131, and virulence associated traits among *Escherichia coli* isolates from men with pyelonephritis or cystitis and healthy controls. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:E173-80. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12123>
41. **Soto SM.** Expresión de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:479-80. <http://dx.doi.org/10.1157/13092461>
42. **Lobos O, Padilla A, Padilla C.** Análisis genético y propiedades virulentas de cepas de *Escherichia coli* aisladas desde infección vaginal. *Rev Chil Infectol.* 2013;30:381-7. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000400005>
43. **Spurbeck RR, Dinh PC, Walk ST, Stapleton AE, Hooton TM, Nolan LK, et al.** *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. *Infect Immun.* 2012;80:4115-22. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00752-12>
44. **Yun KW, Kim HY, Park HK, Kim W, Lim IS.** Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *J Microbiol Immunol Infect.* 2014;47:455-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2013.07.010>

ARTÍCULO ORIGINAL

## Posible transmisión oral de la enfermedad de Chagas en trabajadores del sector de los hidrocarburos en Casanare, Colombia, 2014

Liliana Patricia Zuleta-Dueñas<sup>1</sup>, Ángela Johana López-Quiroga<sup>1</sup>,  
Fernando Torres-Torres<sup>2</sup>, Oneida Castañeda-Porras<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Vigilancia en Salud Pública, Secretaría de Salud de Casanare, Yopal, Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Secretaría de Salud de Casanare, Yopal, Colombia

**Introducción.** *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, puede transmitirse por vía oral tras la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas. En la semana epidemiológica 14 del 2014, se notificaron dos casos de enfermedad aguda de Chagas en Paz de Ariporo, Casanare, entre trabajadores del sector de los hidrocarburos, episodio que motivó la investigación epidemiológica en el área.

**Objetivo.** Caracterizar la población afectada, establecer medidas de control y confirmar el brote.

**Materiales y métodos.** Se hizo una investigación de brote con los siguientes componentes: a) búsqueda de personas sintomáticas (cuadro clínico sugerente de enfermedad de Chagas según la definición de caso), para remitirlas a atención médica; b) aplicación de una encuesta entomológica en 192 de 197 viviendas; c) inspección sanitaria y análisis microbiológico de muestras de alimentos, y d) estudio de reservorios. La organización y el análisis de los datos se hicieron mediante estadística descriptiva con el programa Epi-Info 7.1.5. Asimismo, se establecieron los índices de infestación en el domicilio y el peridomicilio.

**Resultados.** Se registraron 552 personas expuestas y se confirmaron por laboratorio 40 casos (7,2 %); siete casos se dieron en mujeres (17,5 %) y 33 en hombres (82,5%), es decir, en una relación de 1:5. La edad promedio fue de 39,1 ( $\pm$  10,8) años, la tasa de ataque, de 7,2 %, y la letalidad, de 5 % (2/40). Los signos y síntomas incluyeron fiebre en el 100 % de los casos, cefalea en el 80 %, mialgias y artralgias en el 65 %, edema facial en el 55 %, y dolor abdominal en el 37,5 %. El tiempo promedio de incubación fue de 17 (3-21) días. El índice de infestación de *Rhodnius prolixus* fue de 3,3 % en el domicilio y de 2,2 % en el peridomicilio. En los cinco restaurantes inspeccionados, se encontraron condiciones sanitarias deficientes y alimentos con niveles de contaminación microbiológica inaceptables. Por último, un perro y dos zarigüeyas fueron positivos para los anticuerpos IgG en la prueba ELISA.

**Conclusiones.** Mediante el análisis de las características epidemiológicas, ambientales y sanitarias, se confirmó un brote agudo de enfermedad de Chagas por exposición ocupacional y de posible transmisión oral, que podría ser el de mayor proporción reportado hasta la fecha en Colombia.

**Palabras clave:** enfermedad de Chagas/transmisión; *Trypanosoma cruzi*; salud laboral; epidemiología descriptiva.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3153>

### Possible oral transmission of Chagas disease among hydrocarbons sector workers in Casanare, Colombia, 2014

**Introduction:** *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent for Chagas disease, can be transmitted by oral intake of contaminated food or drinks. During epidemiological week 14 of 2014, two cases of acute Chagas disease were notified among hydrocarbons sector workers in Paz de Ariporo, Casanare.

**Objective:** To characterize the affected population, to establish control and prevention measures and to confirm the outbreak.

**Materials and methods:** We conducted an outbreak investigation that included the following components: a) Search for symptomatic people compatible with Chagas disease according to the case definition for their referral to medical services; b) entomological survey (192/197 houses); c) sanitary inspection and microbiological analysis of food samples; and d) study of reservoirs. Data management and analysis were done with Epi-Info 7.1.5 using descriptive statistics. We also calculated intradomicile and peridomicile triatomine infestation indexes.

#### Contribución de los autores:

Liliana Zuleta-Dueñas, Ángela Johana López-Quiroga y Fernando Torres-Torres: concepción y diseño del estudio  
Oneida Castañeda-Porras: organización del manuscrito

Todos los autores participaron en el análisis e interpretación de los datos y en la escritura del manuscrito.

**Results:** We detected 552 exposed people; 40 had the disease (7.2%), of whom seven were women (17,5%) and 33, men (82.5%), i.e., a male-female ratio of 5:1. The mean age was  $39.1 \pm 10.8$  years; the attack rate was 7.2% and lethality, 5% (2/40). Symptoms included fever (100% of cases), headache (80%), myalgia and arthralgia (65%), facial edema (55%), and abdominal pain (37.5%). The mean incubation time was 17 days (range: 3-21). *Rhodnius prolixus* domiciliary infestation index was 3.3 % and 2.2% in the peridomicile. In the five restaurants inspected sanitary conditions were deficient and food samples were microbiologically non-conforming. We found a dog and two opossums positive for IgG antibodies by ELISA.

**Conclusions:** Environmental, sanitary and epidemiological conditions at the place confirmed an outbreak of Chagas diseases related to occupational exposure, possibly by oral transmission, which may be the largest to date in Colombia.

**Key words:** Chagas disease/transmission; *Trypanosoma cruzi*; occupational health; epidemiology, descriptive.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3153>

La enfermedad de Chagas es causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi* (1,2), y pasa por dos fases sucesivas: aguda, la cual dura de seis a ocho semanas, y crónica, con una duración indeterminada que, en la mayoría de los pacientes, se prolonga varios años después de su inicio e, incluso, indefinidamente, y es detectable solo mediante pruebas serológicas o parasitológicas. De 10 a 40 % de las personas infectadas puede sufrir daño cardíaco o gastrointestinal crónico; la mortalidad durante la fase aguda es de alrededor de 5 % y en la fase crónica se ubica por encima de 50 % cuando hay disfunción cardíaca (3,4).

La enfermedad se transmite de diversas formas, principalmente por contacto de las mucosas o la piel herida con las heces del vector infectado, o también por transfusiones, por la vía congénita, por trasplante de órganos, por accidentes de laboratorio y por vía oral (5), la cual es causa frecuente de la enfermedad aguda de Chagas (6,7). La contaminación de los alimentos por vectores selváticos y reservorios vertebrados de *T. cruzi* es un factor importante para la transmisión por esta vía, que en el ser humano se produce de forma esporádica mediante el consumo de carne cruda o poco cocida y jugos de frutas contaminados con heces de triatominos infectados, con orina o con secreciones anales de marsupiales infectados, o, incluso, por el consumo de insectos.

El período de incubación de la enfermedad es de cinco días en promedio, y puede provocar una miocarditis aguda por transmisión parasitaria masiva,

con una alta tasa de mortalidad y manifestaciones clínicas más graves en edades más tempranas (5,8-12).

En Brasil, Venezuela y Bolivia, se han documentado brotes por posible transmisión oral, en los cuales las circunstancias comunes han sido la estadia de las personas en zonas geográficas con presencia de vectores, y la transmisión por consumo de jugos de frutas, como la guayaba, el açai o el majo. En dichos brotes, el número de personas afectadas ha oscilado entre tres y 103 casos confirmados (13-26).

En los departamentos colombianos de Antioquia, Cesar, Magdalena, Norte de Santander y Santander, se han reportado desde 1992, por lo menos, 12 brotes de enfermedad aguda de Chagas asociados con la transmisión oral por ingestión de alimentos contaminados (vino de palma y jugos de naranja) con *T. cruzi* proveniente de restos de triatominos o excrementos de marsupiales, en los que el número de afectados osciló entre uno y 14 casos confirmados (27-33), con una mortalidad de 38,5 % (5/13) en 1999 (27), de 20,0 % (2/10) en 2008 (28), de 15,0 % en 2008-2009 (33) y de 9,1 % (1/11) en 2009 (30). Debido a las características epidemiológicas de los brotes y a las manifestaciones clínicas de la enfermedad, el mecanismo de transmisión se atribuyó a la vía oral; sin embargo, en la mayoría de los estudios no se determinó la fuente de contaminación ni el vector implicado (34). En ninguno de los brotes reportados, la población afectada había involucrado trabajadores del sector de los hidrocarburos.

En la semana epidemiológica 14 del 2014, la Secretaría de Salud de Casanare recibió la notificación de dos casos de enfermedad aguda de Chagas confirmados por exámenes parasitológicos directos, y observación de gota de sangre en fresco y gota gruesa. El primero se notificó el 2 de

Correspondencia:

Liliana Patricia Zuleta, Secretaría de Salud de Casanare, Carrera 21 N° 8 -32, Yopal, Casanare

Teléfono: (311) 522 7082

vspcasanare1@gmail.com

Recibido: 02/12/15; aceptado: 28/08/16

abril y, el segundo, el 4 de abril, en trabajadores procedentes de la vereda Centro Gaitán en el municipio de Paz de Ariporo. Los dos manifestaron frecuentar sitios como el restaurante y el hotel de la zona. Ante la presencia de dos casos agudos confirmados y relacionados, se ratificó la aparición de un brote de la enfermedad según los criterios establecidos en los lineamientos nacionales (35,36). La Secretaría de Salud expidió la alerta epidemiológica departamental el 8 de abril, notificó el brote al Centro Nacional de Enlace (CNE) del Ministerio de Salud y Protección Social (Minsalud) y coordinó las acciones para efectuar la investigación de campo.

En ese marco, el objetivo de este estudio fue describir el brote de enfermedad aguda de Chagas en el corregimiento de Caño Chiquito, vereda de Centro Gaitán, en el municipio de Paz de Ariporo (Casanare), caracterizar la población estudiada, determinar la posible forma de transmisión, y establecer medidas de control y mecanismos de prevención.

### Materiales y métodos

Se hizo un estudio descriptivo de investigación del brote mediante: a) la búsqueda de personas sintomáticas con cuadro clínico de enfermedad de Chagas acorde con la definición de caso, para remitirlas a atención médica; b) la aplicación de una encuesta entomológica; c) la inspección sanitaria y el análisis microbiológico de muestras de alimentos, y d) el estudio de los reservorios del parásito.

### Área de estudio

Paz de Ariporo, municipio colombiano ubicado en el nororiente del departamento de Casanare, se encuentra a 456 km de Bogotá y a 90 km de Yopal, su capital. En cuanto al número de habitantes, es el segundo municipio de Casanare después de Yopal y el primero en extensión (1'380.000 hectáreas);

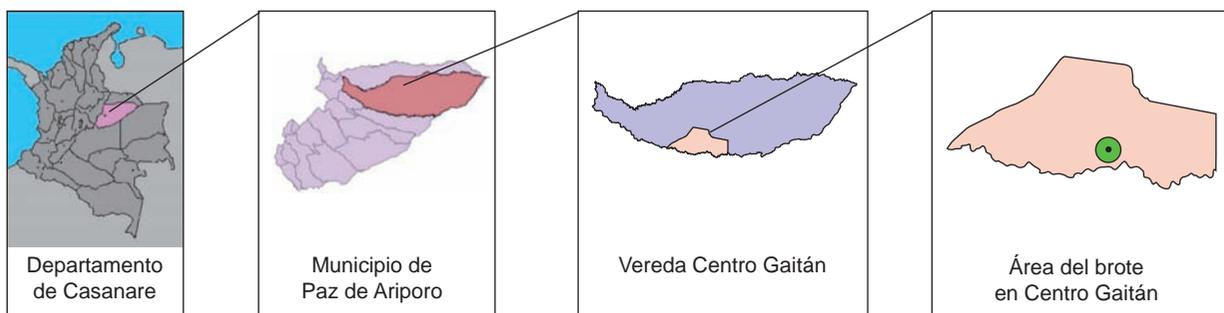
tiene una temperatura promedio de 28 °C, una altura de 270 msnm (37), una precipitación de 2.150 mm al año y una humedad relativa entre 70 y 90 %; los tres primeros meses del año son los de mayor temperatura, y los más fríos y de mayor humedad son junio y julio. Limita al norte con el municipio de Hato Corozal, al este, con los departamentos de Arauca y Vichada, al sur, con el municipio de Trinidad, y al oeste, con los municipios de Pore y Támara. El municipio está conformado por 53 veredas integradas en cinco corregimientos, entre ellos, Caño Chiquito, el cual tiene diez veredas, entre ellas Centro Gaitán, conformada por los sectores Normandía, San Esteban, Trinidad y Caño Chiquito, sitio este de gran concentración de compañías de explotación petrolera (38) (figura 1).

### Búsqueda de personas sintomáticas

La búsqueda de personas sintomáticas con cuadro clínico de enfermedad de Chagas en fase aguda para remitirlas a atención médica, se llevó a cabo mediante la búsqueda activa institucional y la búsqueda activa comunitaria, según lo dispuesto en los lineamientos nacionales para la vigilancia y control de eventos de interés en salud pública (39).

La definición de caso confirmado de la enfermedad aguda se ajustó a lo estipulado en el protocolo de vigilancia, es decir, todo caso probable que cumpla con uno o más de los criterios de laboratorio establecidos (35).

*Búsqueda activa institucional.* En las instituciones prestadoras de servicios de salud públicas y privadas del municipio de estudio y de los cercanos (Yopal, Hato Corozal, Pore, Trinidad y San Luis de Palenque), se revisaron los registros individuales de prestación de servicios (39,40) que tuvieran consignados los síntomas asociados descritos en la décima versión de la Clasificación Internacional de



**Figura 1.** Localización de la vereda Centro Gaitán, sector Caño Chiquito, Paz de Ariporo, Casanare  
Fuente: Laboratorio de Entomología Médica, Secretaría de Salud de Casanare

Enfermedades (CIE-10): fiebre persistente, fiebre no especificada, fiebre recurrente no especificada, fiebre del dengue (dengue clásico), hepatomegalia no especificada en otra parte, conjuntivitis por clamidias, fiebre tifoidea, edema localizado, infección urinaria de sitio no especificado, otras enfermedades virales no especificadas, enfermedad aguda de Chagas, rinoфарingitis aguda, resfriado común y dolor localizado en otras partes del abdomen.

La definición de caso probable fue la siguiente: pacientes procedentes del municipio de Paz de Ariporo, corregimiento de Caño Chiquito, vereda de Centro Gaitán y áreas de desplazamiento de personas debido a la actividad petrolera, que hubieran consultado entre el 15 de febrero y el 15 de abril de 2014 por fiebre continua o intermitente durante más de siete días.

**Búsqueda activa comunitaria.** Se llevó a cabo en las instalaciones del pozo de explotación de hidrocarburos ubicado en la zona, y en los restaurantes, hoteles y demás establecimientos comerciales del área.

El caso probable se definió como cualquier persona procedente del municipio de Paz de Ariporo, corregimiento de Caño Chiquito, vereda de Centro Gaitán, y de las áreas de desplazamiento debido a la actividad petrolera, que hubieran visitado la zona y consumido alimentos en los restaurantes y otros sitios de expendio, o pernoctado en el hotel o en otros lugares disponibles entre el 15 de febrero y el 15 de abril de 2014, y hubieran presentado fiebre continua o intermitente durante más de siete días, además de signos y síntomas indicativos de enfermedad de Chagas.

Se analizaron las variables de sexo, edad, fecha de inicio de síntomas, tipo de atención, afiliación al Sistema General de Seguridad Social en Salud, lugar de residencia, lugar de trabajo, ocupación según los diez grandes subgrupos de la Clasificación Internacional Uniforme de Ocupaciones (CIUO) (41), tipo de atención médica y condición final (vivo o muerto).

### **Recolección de muestras**

Previa firma del consentimiento informado, se obtuvo una muestra de sangre capilar obtenida por punción digital y venopunción a las personas clasificadas como casos probables, en tubos con citrato de sodio al 3,8 % (4 ml), que luego se transportaron a temperatura ambiente y sin refrigerantes para el procesamiento de las muestras y la obtención del suero.

Se hizo el examen de gota gruesa para el diagnóstico de parásitos en sangre, el frotis de sangre periférica específica para el de protozoarios hemáticos y el microhematocrito para las formas tripomastigotas de *T. cruzi*, sometiendo las muestras de sangre de cada paciente a centrifugación en un capilar de 5 µl para la detección bajo el microscopio de los parásitos en el sobrenadante (fracción no celular).

Mediante el análisis serológico, se identificaron anticuerpos por IgG utilizando el ensayo inmunoenzimático UMELISA CHAGAS, en el cual se utilizan como fase sólida tiras del ultramicro-ELISA revestidas con tres péptidos sintéticos representativos de diferentes regiones inmunodominantes de la membrana de *T. cruzi* obtenidos mediante síntesis química en fase sólida. Esta prueba se considera reactiva cuando la fluorescencia de la muestra es igual o mayor que el nivel de corte de 0,300 y se confirma mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) cuando el anticuerpo específico anti-*T. cruzi* presente en la muestra de suero reconoce y se une al antígeno (epimastigotes de *T. cruzi*, cepas DTU TcI colombianas), fijado a las láminas a una concentración de 10 mg/ml en una solución salina de fosfato, con punto de corte igual o mayor de 1/32, formando un complejo antígeno-anticuerpo al que se le adiciona el conjugado que corresponde a una globulina anti-IgG humana marcada con fluoresceína, el cual reconoce al anticuerpo y se une a él formando un complejo fluorescente que es detectado mediante microscopía de fluorescencia UV (42).

Para las pruebas moleculares, se obtuvo sangre completa en ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) e igual proporción de clorhidrato de guanidina 6M, y se la analizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa convencional en tiempo real con TaqMan marcadas con dos fluorocromos (qPCR Taqman Multiplex) para la detección y cuantificación simultánea de ADN satelital de *T. cruzi* y del inserto *Arabidopsis thaliana* en el plásmido IAC (42); la tipificación se hizo mediante la secuencia intergénica del mini-exón (SL-IR) del gen 24 Sa y de las regiones 18S (Hernández DC, León CM, Valencia-Hernández C, Vera MJ, Cucunubá AM, Flórez AC, *et al.* Molecular tracking of Chagas disease outbreaks by possible oral transmission route in Colombia. 13th International Congress of Parasitology; México: ICOPA XIII; 2014. p. 1). Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo con 5µl de ADN resuspendido en un volumen final de 20 µl; las

condiciones óptimas del ciclo fueron de 10 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y a 58 °C durante 1 minuto (43).

En el Laboratorio de Salud Pública de la Secretaría de Salud de Casanare, se hicieron las pruebas parasitológicas y de inmunodiagnóstico, y en el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud - Red Chagas, las pruebas moleculares en muestras de humanos y reservorios. Los casos confirmados fueron remitidos a revisión médica.

#### **Aplicación de la encuesta entomológica**

Se aplicó una encuesta entomológica mediante inspección y captura del vector en 90 de las 93 viviendas de la vereda de Centro Gaitán y en 102 de las 104 de Caño Chiquito, incluidos los lugares de expendio de alimentos. Para la captura de triatominos, se utilizó la trampa descrita por Angulo, et al. (44,45), en la cual se emplea un cebo vivo con adhesivos o refugios para atrapar insectos, y se evita la exposición del investigador al riesgo y la intervención de ecótopos naturales (45); se colocaron varias durante tres días entre las 15:00 y las 6:00 horas en los sitios de muestreo.

Asimismo, hubo búsqueda activa por disección de ecótopos (45) en el domicilio y el peridomicilio. Los sitios de muestreo fueron el pozo de la zona (5°32' 4,3" N; 71° 6' 49,5" O), el hotel donde pernoctaban los trabajadores (05°29'23.8" N; 071°07'05.9" O) y el restaurante donde se consumían los alimentos (05°29'25.5"; 071°07'09.7" O).

#### **Índice de infestación domiciliar de triatominos**

El material entomológico recolectado, debidamente rotulado y empacado, fue transportado por los técnicos al Laboratorio de Entomología de la Secretaría de Salud del municipio, para su posterior análisis y cálculo del porcentaje de viviendas infestadas (índice de infestación en domicilio y peridomicilio) (46,47).

#### **Inspección sanitaria y análisis microbiológico de muestras de alimentos**

Se levantó un acta de inspección sanitaria con los datos sobre preparación, consumo, expendio y depósito de alimentos y bebidas recolectados mediante observación. Se verificó el estado de las instalaciones y las condiciones de saneamiento en las áreas de preparación de alimentos, así como lo concerniente al manejo, la preparación y el servido de alimentos, al personal manipulador, a la conservación, el manejo y el rotulado de las materias primas, y a la seguridad y la salud en el trabajo (48).

Asimismo, se tomaron muestras de los alimentos preparados (arroz, sopa) y del punto de recolección del agua para cocinar, y de los frotis de las superficies inertes (mesa, cubiertos) y de superficies vivas (manos de las manipuladoras de alimentos). Las muestras se conservaron en neveras idóneas a temperatura de refrigeración y bajo condiciones de asepsia. Por último, se dio asistencia técnica sobre buenas prácticas de manufactura y conservación de alimentos (49,50).

#### **Estudio de reservorios**

Los equipos del Ministerio de Salud, el Instituto Nacional de Salud y la Secretaría de Salud de Casanare inspeccionaron diversos puntos para detectar reservorios domésticos e hicieron búsqueda pasiva de reservorios silvestres mediante la ubicación de seis trampas Tomahawk medianas en el peridomicilio del restaurante y cinco en el del hotel. Dentro del restaurante y en sus alrededores, se detectaron perros, murciélagos, ratas y ratones. A dos perros que permanecían en el área social del restaurante se les tomó muestra de sangre completa para la detección y cuantificación simultáneas de ADN satelital de *T. cruzi* mediante qPCR (TaqMan Multiplex) (42). También, se capturaron dos zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*) y se detectaron primates del género *Alouatta*.

#### **Consideraciones éticas**

El estudio se apegó a las pautas y recomendaciones éticas internacionales y a la normativa nacional vigente (51) para la realización de acciones de control y prevención en salud pública (52,53). Se leyó y firmó el consentimiento informado autorizando la toma de muestras y el respectivo examen de laboratorio para la detección de los portadores de la enfermedad de Chagas. Los pacientes con la enfermedad aguda fueron remitidos a atención médica y recibieron tratamiento etiológico con benzonidazol durante 60 días, aproximadamente. Asimismo, se solicitó el consentimiento de los participantes para la inspección domiciliar, la captura de triatominos y la toma de muestras de los reservorios del parásito.

#### **Resultados**

##### **Caracterización del brote**

Durante la búsqueda activa institucional, se revisaron 13.479 registros de prestación de servicios de salud, de los cuales se seleccionaron 1.308 (9,7 %) de pacientes con sintomatología sugestiva de enfermedad de Chagas. Se encontraron

55 (4,2 %) que cumplían con la definición de caso probable y 28 se confirmaron por laboratorio (50,9 %).

En la búsqueda activa comunitaria, se encuestaron 28 personas, 23 (82,1 %) en el pozo y cinco (17,9 %) en el restaurante o el hotel; de estos, 20 (71,4 %) cumplían con la definición de caso probable, 19 (95,0 %) se confirmaron por laboratorio y uno (5,0 %) se descartó por transmisión vectorial.

En la búsqueda de personas sintomáticas, se encontró que siete (4,9 %) de los 47 casos confirmados estaban duplicados, es decir, correspondían a personas halladas en las búsquedas activas institucional y comunitaria, por lo cual, finalmente, hubo 40 (85,1 %) casos confirmados (cuadro 1).

De estos, 33 (82,5 %) correspondían a hombres y ocho (17,5 %) a mujeres, en una relación de 5:1; la edad media fue de 39,1 ( $\pm$  10,8) años (cuadro 2) y, por grupos de edad, los casos se distribuyeron así: entre 20 y 29 años, siete (17,5 %), entre 30 y 39, 16 (40,0 %), entre 40 y 49, 11 (27,5 %), entre 50 y 59, cuatro (10,0 %), y de 60 y más años, dos (5,0 %).

En cuanto a la afiliación a salud, 33 (82,5 %) pertenecían al régimen contributivo, seis (15,0 %) al subsidiado y uno (2,5 %) no estaba afiliado. Provenían de Casanare 23 (59,0 %), seis (15,4 %) de Bogotá, tres (7,7 %) de Boyacá, dos (5,1 %) de cada uno de los departamentos de Antioquia, Sucre y Tolima, uno (2,6 %) de Cauca y otro (2,6 %) de Santander; 34 (85,0 %) de los pacientes trabajaban

con empresas vinculadas al sector petrolero, tres (7,5 %), en el restaurante, dos (5,0 %), en el hotel, y de uno (2,5) de ellos no había datos.

Con base en la CIUO, las ocupaciones se distribuyeron así: 12 (30,0 %) auxiliares, 11 (27,5 %) oficiales u operarios, cinco (12,5 %) profesionales, cuatro (10,0 %) operadores, dos (5,0 %) técnicos, un (2,5 %) trabajador no calificado, y de cinco (12,5 %) de ellos no se tenía información. Tuvieron atención médica ambulatoria 25 (62,5 %) pacientes y 15 (37,5 %) fueron hospitalizados; en cuanto a la condición final, 38 (95,0 %) sobrevivieron y dos (5,0 %) murieron. En cuanto a los signos y síntomas manifestados por los pacientes, su distribución se presenta en la figura 2.

Los resultados de las pruebas parasitológicas fueron positivas en 15 (37,5 %) pacientes, en otros 15 (37,5 %) fueron negativos, y de siete (17,5 %) no hubo información, en tanto que en tres (7,5 %) casos no se hicieron; en las pruebas de inmunodiagnóstico, el 95,0 % (38/40) tuvo un resultado positivo y el 5,0 % (2/40), uno negativo; en 37,5 % (15/40) de los casos se hizo la PCR con resultado positivo en nueve (60,0 %) de ellos, negativo en uno (6,7 %) y en cinco (33,3 %) no se registró un resultado; un año después todos tuvieron un resultado negativo en la prueba de seguimiento (cuadro 3).

Todos los pacientes manifestaron tomar su alimentación en el mismo restaurante y haber permanecido en la zona entre el 1° de febrero y el 30 de marzo

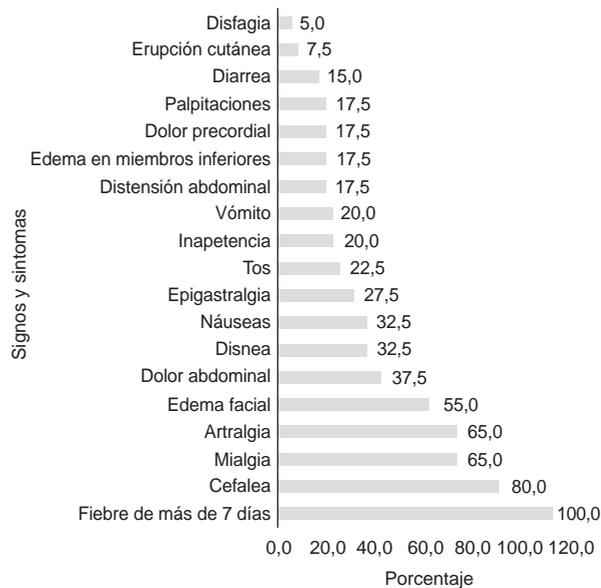
**Cuadro 1.** Búsqueda de personas sintomáticas durante el brote de enfermedad aguda de Chagas, Paz de Ariporo, Casanare, 2014

Búsqueda activa institucional					
Municipio	No. IPS	Total registros n (%)	Eventos relacionados n (%)	Casos probables n (%)	Casos confirmados n (%)
Paz de Ariporo	6	7.011 (52,0)	114 (8,7)	29 (52,7)	17 (60,7)
Hato Corozal	2	1.367 (10,1)	2 (0,2)	2 (3,6)	2 (7,1)
Yopal	1	242 (1,8)	11 (0,80)	11 (20,0)	6 (21,4)
San Luis de Palenque	1	4.800 (35,7)	1.167 (89,2)	8 (14,5)	1 (3,6)
Pore	1	13 (0,1)	13 (1,0)	4 (7,4)	1 (3,6)
Trinidad	1	46 (0,3)	1 (0,1)	1 (1,8)	1 (3,6)
Total	12	13.479 (100,0)	1.308 (100,0)	55 (100,0)	28 (100,0)
Búsqueda activa comunitaria					
Municipio	Lugar	Personas encuestadas n (%)	Casos probables n (%)	Casos confirmados n (%)	Casos descartados n (%)
Paz de Ariporo	Pozo	23 (82,1)	16 (80,0)	16 (84,2)	
	Restaurante/Hotel	5 (17,9)	4 (20,0)	3 (15,8)	1 (100,0)
Total		28 (100,0)	20 (100,0)	19 (100,0)	1 (100,0)

IPS: Institución prestadora de servicios de salud

**Cuadro 2.** Estadística descriptiva de los casos de enfermedad aguda de Chagas durante el brote por posible transmisión oral, Paz de Ariporo, Casanare, 2014

Medida estadística	Mujeres	Hombres	Total
Media	36,4	39,7	39,1
Mediana	38	38	38
Moda	38	30	26
Varianza	67,6	126,9	116,0
Desviación estándar	8,2	11,3	10,8
Mínimo	26	20	20
Máximo	48	70	70
25 %	30	31	30,5
75 %	46,5	46	46
Total	7	33	40

**Figura 2.** Signos y síntomas manifestados por las 40 personas con enfermedad aguda de Chagas durante el brote por posible transmisión oral, Paz de Ariporo, Casanare, 2014

de 2014; con base en este tiempo de permanencia, en las fechas de inicio de síntomas y el tiempo de incubación de la infección (establecidas según el protocolo del Instituto Nacional de Salud), se estableció que la exposición probablemente se presentó entre el 2 y el 6 de marzo, y que el tiempo promedio de incubación fue de 17 días, con un mínimo de tres días y un máximo de 21 (figura 3). La tasa de ataque fue de 7,3 % (40/552) y la letalidad fue de 5,0 % (2/40).

### Encuesta entomológica

Se inspeccionó el 97,5 % (192/197) de las viviendas, 102 (53,1 %) en Caño Chiquito y 90 (46,9 %) en Centro Gaitán; 74 (38,5 %) de ellas se ubicaban en el centro poblado, 56 (75,7 %) en Caño Chiquito y

18 (24,3 %) en Centro Gaitán, y 118 (61,5 %) en el área rural dispersa, de las cuales 46 (39,0 %) pertenecían a Caño Chiquito y 72 (61,0 %) a Centro Gaitán. La población total era de 796 habitantes: 47,7 % (380) en Caño Chiquito y 52,3 % (416) en Centro Gaitán (cuadro 4). La mediana de habitantes por vivienda fue de cuatro ( $\pm 2,5$ ), con un valor mínimo de 0 y uno máximo de 15; 52 (27,1 %) de los habitantes manifestaron haber visto triatomíneos: 16 (30,8 %) en Caño Chiquito y, 36 (69,2 %), en Centro Gaitán (figura 4).

### Descripción de la vivienda

Se registraron 151 (78,6 %) viviendas construidas con bloque, 49 (25,5 %) eran de adobe, 10 (5,2 %) de madera y sin paredes, y una (0,5 %) de bahareque; 82 (42,7 %) tenían paredes empañetadas, 56 (29,2 %) sin empañetar y 53 (27,6 %) parcialmente empañetadas; 164 (85,4 %) tenían techo de cinc, 48 (25,0 %) de palma, 38 (19,8 %) de teja de Eternit®, y una (0,5 %) de paja y de madera; 172 (89,6 %) tenían piso de cemento, 53 (27,6 %) de tierra, 18 (9,4 %) de baldosa y una (0,5 %) de madera; 66 (34,4 %) contaban con gallinero, 41 (21,4 %) con marranera, 22 (11,5 %) con caney (enramada), 16 (8,3 %) con caballeriza, 12 (6,3 %) con granero, 10 (5,2 %) con pesebrera y rancho, una con conejera, una con galpón y otra con horno (0,5 %, cada una).

Se encontró una población total de 214 perros y 192 gatos. En las viviendas se encontraron 112 (58,3 %) perros, 100 (52,1 %) gallinas, 88 (45,8 %) gatos, 67 (34,9 %) cerdos, 44 (22,9 %) vacas, 47 (24,5 %) animales de la especie equina, un pato y un venado (1,0 %, cada uno). Los encuestados manifestaron haber visto animales silvestres: 97 (50,5 %) de ellos habían visto zarigüeyas en los alrededores de la vivienda, y 35 (36,1 %), dentro de ella; 35 (18,2 %) habían visto armadillos; 41 (21,4 %), ratas en los alrededores y 33 (80,5 %), dentro de la vivienda; 71 (37,0 %) habían visto ratones, 58 (81,7 %) de ellos dentro de la vivienda; 148 (68,9 %), murciélagos, 102 (68,9 %) de ellos dentro de la vivienda; cuatro (2,1 %), conejos; 77 (40,1 %) vieron osos hormigueros, 13 (16,9 %) de ellos dentro de la vivienda; ocho (4,2 %) vieron osos perezosos, dos (25,0 %) de ellos, dentro de la vivienda; 42 (21,9 %), primates, cuatro (9,5 %) de ellos dentro de la vivienda; 25 (13,0 %) habían visto lapas, y 41 (21,3 %), picures, tres (7,3 %) de ellos dentro de la vivienda. Los materiales o cultivos de riesgo en el entorno de las viviendas se presentan en la figura 5.

**Cuadro 3.** Resultados de las pruebas de inmunodiagnóstico y moleculares de las 40 personas con enfermedad aguda de Chagas durante el brote por posible transmisión oral, Paz de Ariporo, Casanare, 2014

No. de caso	Sexo	Lugar de trabajo	Condición final	ELISA en suero			IFI en suero			PCR			Estado cardiológico	
				Resultado	Absorbancia	Índice	Título (IFI)	Prueba inicial	ADN <i>T. cruzi</i>	Parasitemia <i>T. cruzi</i>	Prueba final	ADN <i>T. cruzi</i>		Parasitemia <i>T. cruzi</i>
01	H	Pozo	Vivo	Positivo	1,794	5,98	1/256							
02	H		Vivo	Positivo	0,305	1,02	1/64							
03	M	Restaurante	Vivo	Positivo	1,186	3,95	1/256							
04	M	Restaurante	Vivo	Positivo	1,65	5,5	1/128							
05	H		Vivo	Positivo	1,71	5,7	1/256							
06	M		Vivo	Positivo	0,707	2,36	1/64							
07	H		Vivo	Positivo	4,93	-	1/256	18/04/2014	Positivo	33,5	09/04/2015	Negativo	0	NYHA Clase II, Falla cardíaca AHA C
08	H		Vivo	Positivo	1,303	4,34	1/128	09/05/2014	Positivo	3,32	09/04/2015	Negativo	0	NYHA Clase I, ECO FE 53 %
09	M	Restaurante	Vivo	Positivo	1,058	3,53	1/64							
10	H		Vivo	Positivo	1,16	-	1/256							
11	H		Vivo	Positivo	0,52	-	1/256	29/08/2014	Negativo	0	09/04/2015	Negativo	0	NYHA Clase II, FE 55 %
12	H		Vivo	Positivo	1,509	5,03	1/128							
13	H		Vivo	Positivo	0,39	1,3	1/64							
14	M		Vivo	Positivo	0,545	-	1/515	09/04/2014	Positivo	13,35	09/04/2015	Negativo	0	NYHA Clase II, FE 61 %
15	H		Vivo	Positivo	1,215	3,708	1/32							
16	H		Vivo	Negativo	1,598	-	1/598	18/04/2014	Positivo	2,55	09/04/2015	Negativo	0	NYHA Clase I, FE 61 %
17	H		Vivo	Positivo	0,616	-	1/128	18/04/2014	Positivo	1,03	09/04/2015	Negativo	0	NYHA Clase I, ECO FE 55 %
18	H		Muerto	Positivo	0,071	3,23	1/64							
19	H		Vivo	Positivo	1,214	4,05	1/64							
20	H		Vivo	Negativo	0,24	-	1/64	No registra	No registra	No registra	09/04/2015	Negativo	0	NYHA Clase I, ECO FE 55 %
21	H		Vivo	Positivo	1,394	-	1/1024	18/04/2014	Positivo	0,98	09/04/2015	Negativo	0	NYHA Clase I, FE 45 %
22	H	Hotel	Vivo	Positivo	1,233	4,11	1/152							
23	H		Vivo	Positivo	0,884	2,95	1/64							
24	H		Vivo	Positivo	0,646	2,15	1/128							
25	M		Vivo	Positivo	0,675	2,25	1/64							
26	H		Vivo	Positivo	2,091	6,97	1/128							
27	H		Vivo	Positivo	1,486	-	1/512	18/04/2014	Positivo	6,42	09/04/2015	Negativo	0	NYHA Clase I, FE 60 %
28	H		Vivo	Positivo	1,824	6,08	1/64	16/04/2014	Positivo	7,15	09/04/2015	Negativo	0	NYHA Clase I, FE 60 %
29	H		Vivo	Positivo	1,76	5,87	1/256							
30	H		Vivo	Positivo	0,512	1,71	1/512							
31	H		Vivo	Positivo	-	-	1/64	No registra	No registra	No registra	09/04/2015	Negativo	0	NYHA Clase I, FE 56 %
32	H		Vivo	Positivo	0,451	1,5	1/128	No registra	No registra	No registra	09/04/2015	Negativo	0	NYHA Clase I
33	H		Vivo	Positivo	-	-	1/256	18/04/2014	Positivo	7,09	09/04/2015	Negativo	0	NYHA Clase II, FE 65 %
34	H		Vivo	Positivo	0,946	3,15	1/32							
35	M		Vivo	Positivo	67,09/20,42*	-	-							
36	H	Hotel	Vivo	Positivo	-	-	1/32							
37	H		Vivo	Positivo	2,9	-	-	No registra	No registra	No registra	09/04/2015	Negativo	0	NYHA Clase I, FE 50 %
38	H		Vivo	Positivo	3,3	-	1/256							
39	H		Vivo	Positivo	2,87	-	1/128	No registra	No registra	No registra	09/04/2015	Negativo	0	NYHA Clase II, ECO FE 58 %
40	H		Muerto	Positivo	-	-	1/512							

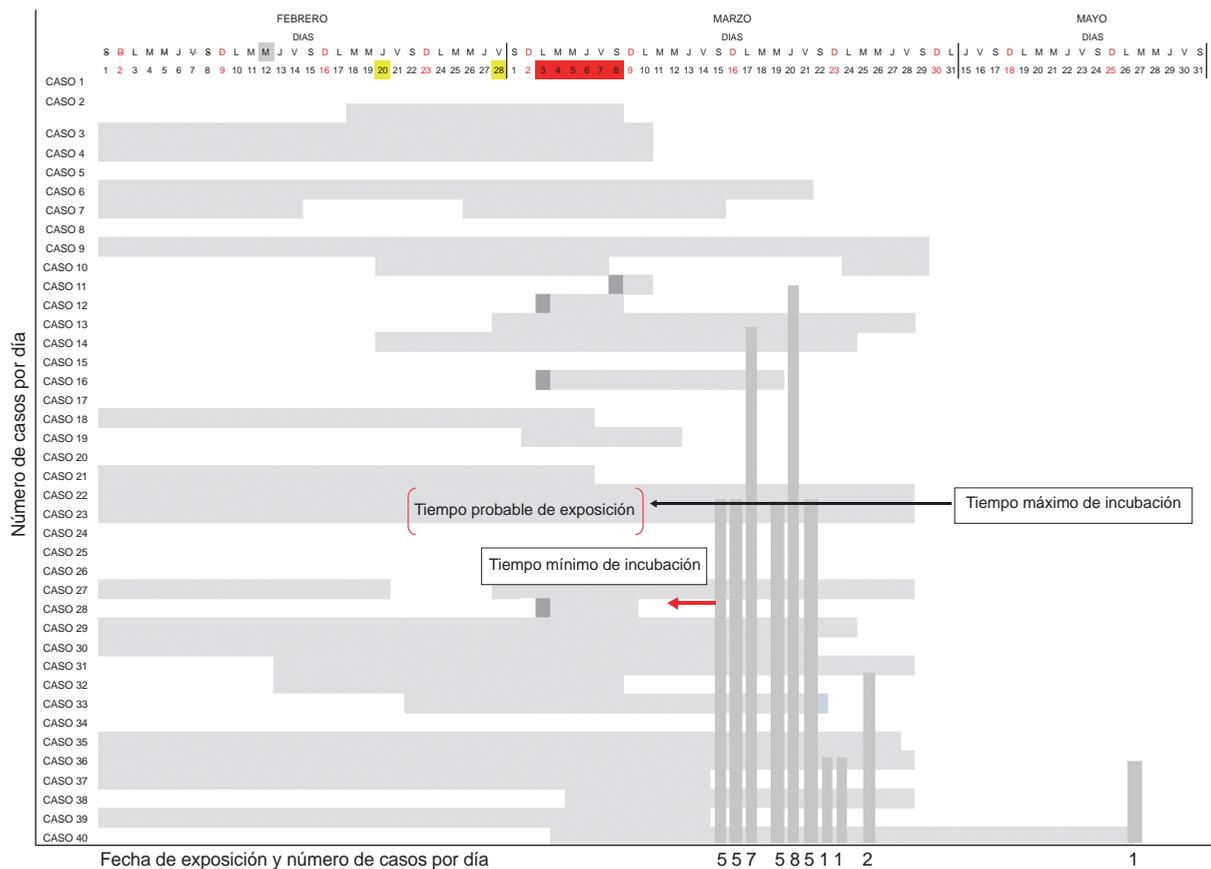
\* La prueba se hizo en el Laboratorio de Salud Pública de Casanare: ELISA IgG Chagas (Tecnosuma), fluorescencia - punto de corte

Fuente: informes de análisis de caso Chagas, Red Chagas Colombia, Fundación Cardio Infantil, Instituto Nacional de Salud

NYHA: *New York Heart Association*; Clase I: actividad ordinaria sin síntomas; Clase II: el paciente tolera la actividad ordinaria, pero existe una ligera limitación de la actividad física y aparece disnea con esfuerzos intensos. No hay limitación de la actividad física; AHA: *American Heart Association Task Force*; AHA C: pacientes sintomáticos, con anomalía estructural; ECO: ecocardiografía; FE: fracción de eyección

**Cuadro 4.** Distribución de la población afectada durante el brote de enfermedad de Chagas de posible transmisión oral en Caño Chiquito y Centro Gaitán, según grupo etario y sexo, Paz de Ariporo, Casanare, 2014

Grupo etario (años)	Caño Chiquito		Centro Gaitán		Total	
	Mujeres n (%)	Hombres n (%)	Mujeres n (%)	Hombres n (%)	Mujeres n (%)	Hombres n (%)
<1	4 (2,1)	1 (0,5)	1 (0,5)	7 (3,0)	5 (1,3)	8 (1,9)
1 a 4	19 (10,2)	17 (8,8)	18 (9,8)	15 (6,5)	37 (10,0)	32 (7,5)
5 a 17	50 (26,7)	46 (23,8)	43 (23,4)	55 (23,7)	93 (25,1)	101 (23,8)
18 a 44	83 (44,4)	96 (49,7)	95 (51,6)	120 (51,7)	178 (48,0)	216 (50,8)
>44	31 (16,6)	33 (17,1)	27 (14,7)	35 (15,1)	58 (15,6)	68 (16,0)
Total	187 (100,0)	193 (100,0)	184 (100,0)	232 (100,0)	371 (100,0)	425 (100,0)



**Figura 3.** Curva epidémica y tiempo probable de exposición en el brote por posible transmisión oral de enfermedad aguda de Chagas, Paz de Ariporo, Casanare, 2014. En gris claro aparece el tiempo probable de exposición; con barras en gris oscuro se presenta el número de casos, y los recuadros en gris oscuro representan el tiempo mínimo de incubación.

**Índice de infestación domiciliar de triatominos**

Se detectaron triatominos en cuatro viviendas: tres (75,0 %) en Centro Gaitán y una (25,0 %) en Caño Chiquito, es decir, índices de infestación domiciliar de 3,3 y 0,98 %, e índices de infestación en el peridomicilio de 1,1 y 0,98 %, respectivamente. No se detectaron estados inmaduros de triatominos. Los especímenes correspondieron a la especie *R. prolixus*.

**Inspección sanitaria y análisis microbiológico de muestras de alimentos**

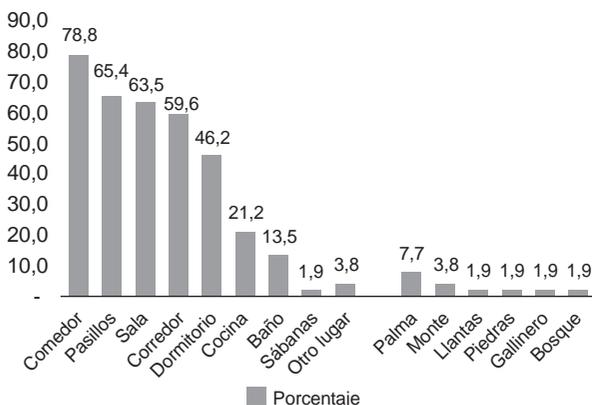
El resultado de los análisis microbiológicos de las muestras de alimentos se presenta en el cuadro 5.

En todos los lugares de expendio de alimentos se detectaron, además, las siguientes deficiencias:

- a) el lavaplatos de la cocina no era adecuado, pues se rebosaban los residuos líquidos y caían al piso,

**Cuadro 5.** Resultados del análisis microbiológico de muestras de alimentos y superficies fijas y vivas, Paz de Ariporo, Casanare, 2014

Muestra	Análisis	Resultado
Agua de grifo	Coliformes totales	No aceptables
	Coliformes fecales	No aceptables
	Mesófilos	No aceptables
	<i>Staphylococcus aureus</i> positiva para coagulasa	Conforme
	<i>Bacillus cereus</i>	Conforme
Arroz	<i>Salmonella</i>	Conforme
	Coliformes totales	Conforme
	Coliformes fecales	Conforme
	Mesófilos	Conforme
	<i>Staphylococcus aureus</i> positiva para coagulasa	Conforme
Sopa	<i>Bacillus cereus</i>	Conforme
	<i>Salmonella</i>	Conforme
	Coliformes totales	Conforme
	Coliformes fecales	Conforme
	Mesófilos	Conforme
Frotis de manos de manipuladores de alimentos	<i>Staphylococcus aureus</i> positiva para coagulasa	Conforme
	<i>Bacillus cereus</i>	Conforme
	<i>Salmonella</i>	Conforme
	Coliformes totales	Conforme
	Coliformes fecales	Conforme
Frotis de mesa	<i>Staphylococcus aureus</i> positiva para coagulasa	Conforme
	Microorganismos mesófilos aerobios	No aceptables
	Hongos y levaduras	No aceptables
Frotis de cubiertos	Microorganismos mesófilos aerobios	No aceptables
	Hongos y levaduras	No aceptables

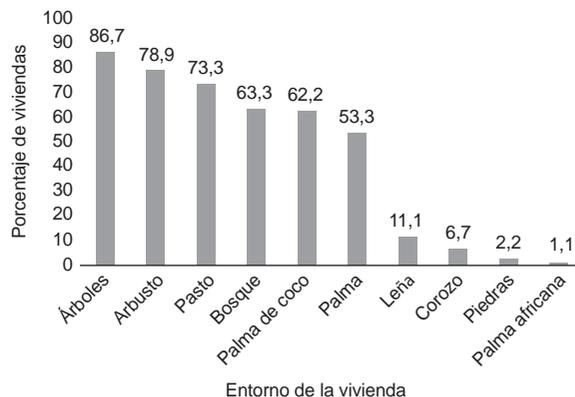


**Figura 4.** Presencia de triatomines en el domicilio y en el peridomicilio según reporte de los habitantes, Paz de Ariporo, Casanare, 2014

había malos olores, el lugar tenía mal aspecto y proliferaban las plagas;

b) la construcción no estaba protegida contra las plagas en dos de las ventanas y en la entrada a la cocina;

c) las paredes, pisos y techos estaban en mal estado, agrietados y sucios, y presentaban residuos de insectos y huevos de araña, y el techo de cinc incrementaba la temperatura y la humedad;



**Figura 5.** Materiales y cultivos de riesgo hallados en el entorno de las viviendas encuestadas durante el brote por posible transmisión oral de enfermedad aguda de Chagas, Paz de Ariporo, Casanare, 2014

d) las canecas de recolección de residuos orgánicos expedían mal olor y en el entorno proliferaban las plagas;

e) el cuarto de almacenamiento de materias primas tenía huecos, se registraban altas temperaturas y humedad, y las alacenas, al ser de madera, eran de difícil limpieza y desinfección;

f) no había protocolos de limpieza y desinfección de frutas y verduras, pues se lavaban y se preparaban con agua de un pozo profundo;

g) los utensilios para el consumo de alimentos pertenecientes a los usuarios del restaurante se dejaban en canastillas plásticas sin protección sobre una mesa de madera bajo un árbol de mango, en la cual también se encontraban cuatro botellas plásticas adecuadas para ponerle alimento y agua a los pájaros;

h) las manipuladoras de los alimentos no habían recibido capacitación en buenas prácticas de manufactura de alimentos y bebidas y no tenían controles periódicos;

i) las mascotas deambulaban cerca de la cocina, y

j) se detectaron riesgos locativos por la irregularidad de los pisos y su mal estado.

**Estudio de reservorios**

Los resultados de la IFI fueron positivos en uno de los dos perros y la serología fue positiva en las dos zarigüeyas capturadas.

**Discusión**

Con base en las características epidemiológicas, ambientales y sanitarias encontradas, se confirmó el brote de enfermedad aguda de Chagas por

exposición ocupacional y de posible transmisión oral, el cual ha sido el de mayor magnitud reportado hasta ahora en Colombia (27-33), con 40 personas afectadas, todas trabajadoras del sector de los hidrocarburos, pero con una mortalidad inferior a la reportada en el país (27,28,30,33).

Los dos hombres fallecidos tenían 45 y 46 años de edad, eran empleados de compañías petroleras, y no fueron detectados durante la búsqueda de personas sintomáticas en el marco de la investigación del brote, sino posteriormente, durante las actividades de seguimiento del brote por parte del Centro Nacional de Enlace del Ministerio. Ambos individuos estuvieron hospitalizados y la causa de su muerte fue infarto agudo de miocardio, sin otra especificación.

Todas las personas afectadas consumían sus alimentos en el mismo restaurante y permanecieron en el sector durante el mismo período. Aun cuando se estableció un posible período de exposición, no hubo un día o evento específico que indicara cuál o cuáles alimentos o bebidas estaban implicados, y no se presentó ninguna minuta por parte del restaurante, lo cual constituyó una limitación para el estudio.

Por otra parte, en la caracterización molecular hecha por el Instituto Nacional de Salud, se encontraron similitudes entre los tripanosomas identificados en los reservorios del parásito y en los humanos (Hernández DC, León CM, Valencia-Hernández C, Vera MJ, Cucunubá AM, Flórez AC, et al. Molecular tracking of Chagas disease outbreaks by possible oral transmission route in Colombia. 13th International Congress of Parasitology; México: ICOPA XIII; 2014. p. 1). Esto, aunado a las características masivas del brote y dada la presencia reportada en la encuesta entomológica de zangüeyas en las viviendas o cerca de ellas, sugeriría que hubo contaminación de los alimentos consumidos, pues la carga parasitaria y la gran transmisión encontradas descartarían la vía vectorial.

La mayoría (33; 82,5 %) de los casos confirmados se produjo en hombres, en una razón de cinco por cada mujer. Todos los afectados estaban en edad productiva y, además de las consecuencias generales de la infección por *T. cruzi* (evolución a la fase crónica, probabilidad de desarrollar enfermedades del corazón e incapacidad para donar sangre y órganos), debieron afrontar otras consecuencias como la incapacidad laboral o la pérdida de su trabajo (14).

Uno de los casos confirmados se dio en una persona sin vinculación formal a ningún régimen de seguridad en salud que trabajaba con el proveedor

de alimentos, lo cual evidencia la importancia de garantizar y verificar la afiliación al sistema de seguridad social para el reconocimiento de incapacidades e indemnizaciones por enfermedad o accidente laboral. Asimismo, se evidenciaron barreras en el acceso a la atención integral del trabajador afectado por parte de las administradoras de riesgos laborales, posiblemente por no conocer la enfermedad y sus consecuencias, y en el reconocimiento de los casos como accidentes de trabajo y enfermedad laboral (48,54) por exposición a un riesgo biológico poco común. La enfermedad no distingue profesión, actividad laboral ni estrato social y ello exige que en los procesos de atención de pacientes expuestos a factores de riesgo biológico se minimicen las barreras de acceso a la atención integral.

En el 2013, la Organización Panamericana de la Salud verificó la interrupción de la transmisión vectorial domiciliar de *T. cruzi* por *R. prolixus* en diez municipios de los departamentos priorizados en el subprograma para la prevención y control de la enfermedad de Chagas en el país (46,55), entre ellos, el municipio de Támara, en Casanare (56). Sin embargo, desde el 2008 se han reportado brotes de la enfermedad aguda en zonas donde no hay presencia de vectores domiciliados y que, por lo tanto, se consideran de baja endemia (5). En ellas, es probable la transmisión oral (28,30,32,33), pues no se presenta en los pacientes el signo de entrada (signo de Romaña o chagoma de inoculación), y la fiebre prolongada es el síntoma más frecuente, seguido por el edema facial (57), tal como se evidenció en este estudio; tales casos deben diagnosticarse, tratarse de inmediato y hacer el seguimiento de las complicaciones cardiovasculares, con frecuencia arritmias, para asegurar la recuperación de los pacientes (5,12).

La vigilancia entomológica de la enfermedad de Chagas comprende un conjunto de acciones que suministran la información necesaria para la implementación de acciones tendientes a la eliminación de las infestaciones por insectos domiciliados de forma permanente en la vivienda humana y en su peridomicilio (46).

El cumplimiento de las acciones de vigilancia, generales y por el laboratorio contempladas en los lineamientos nacionales (35,36,46,47,58), resultan esenciales, no solo para la confirmación de casos de transmisión oral, sino también, para documentar las deficiencias de salubridad indicativas de pobreza, falta de difusión de las estrategias de información,

educación y comunicación en buenas prácticas de manufactura entre los pobladores, insuficiencia de servicios públicos de aseo, acueducto y alcantarillado, implementación insuficiente de estrategias como las de “vivienda saludable” para mejorar las condiciones de la vivienda y, por ende, las de salud (59).

Merece mencionarse la cantidad reducida de personas que manifestaron haber visto triatominos y, sobretudo, el hecho de haberlos visto en el domicilio y no tanto en el peridomicilio, lo cual podría atribuirse al poco conocimiento del vector entre los habitantes del sector. Se necesitan, igualmente, mayores controles y mayor actividad y movilidad de los equipos de saneamiento básico y ambiental y de los encargados de la vigilancia y el control de alimentos, así como una mayor articulación e intercambio de información entre estos equipos y los de vigilancia epidemiológica y por el laboratorio.

En el departamento de Casanare, se ha registrado la presencia de diez especies de vectores transmisores del parásito *T. cruzi*: *Psammolestes arthuri*, *Eratyrus cuspidatus*, *Rhodnius pictipes*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius R. robustus*, *Cavernicola pilosa*, *R. prolixus*, *Triatoma maculata*, *Panstrongylus geniculatus* y *Eratyrus mucronatus*, de los cuales *R. prolixus* es el más abundante (60), como se confirmó en este estudio. Los indicadores históricos de la localidad muestran que, en 1999, Caño Chiquito presentó un índice de infestación domiciliaria de 9,5 %, y Centro Gaitán, de 9,3 %, que, comparados con los resultados obtenidos en este estudio, evidencian una importante disminución, aunque los que se registraron siguen siendo superiores a los propuestos en las metas nacionales de menos de 0,1 %, en tanto que el índice de infestación en el peridomicilio estuvo dentro del límite propuesto de menos de 1,0 % (46).

La falta de higiene en el área de manipulación y preparación de alimentos, y de almacenamiento y lavado de utensilios, es un factor de riesgo importante de la contaminación por insectos rastreros (cucarachas) o alados (moscas) contaminados con heces frescas de triatominos, o por la orina o secreción anal de marsupiales infectados como la zarigüeya (1). Se estableció un alto riesgo de contraer enfermedades transmitidas por alimentos en estos establecimientos de consumo debido a la ausencia de buenas prácticas de manufactura de alimentos y de vigilancia del agua utilizada para su preparación, y a la deficiencia en el servicio de energía, por lo cual las carnes se almacenaban

a temperatura ambiente durante periodos prolongados, creando así un medio óptimo para el crecimiento de bacterias patógenas (58).

En el diagnóstico de las condiciones de salud y de seguridad de las empresas, sobre todo las dedicadas a la explotación de hidrocarburos, se priorizan los riesgos asociados a factores físicos, químicos, biomecánicos o locativos, pero no siempre se detectan o se consideran los riesgos biológicos. Ello demuestra la importancia de determinar los niveles de dichos riesgos y su efecto potencial en la salud del trabajador, y de correlacionarlos con el perfil epidemiológico del municipio o departamento. En este sentido, en áreas endémicas de enfermedades transmitidas por vectores se sugiere considerar la implementación de programas de vigilancia epidemiológica especialmente diseñados para empresas y su integración con el Sivigila (53).

Dada la frecuencia de la transmisión oral de la enfermedad de Chagas, suficiente para considerarla una enfermedad transmitida por alimentos, la vigilancia también debe apuntar a la seguridad de los alimentos, sobre todo en el ámbito institucional (comedores, restaurantes y ventas ambulantes de jugos, entre otros), y a promover acciones de educación orientadas a crear conciencia sobre el riesgo de contaminación de los alimentos con excrementos y secreciones de triatominos, así como a evitar que los alimentos y bebidas preparadas permanezcan sin refrigeración, sobre todo por la noche, e insistir en el lavado rutinario de frutas y verduras, la revisión de los utensilios de cocina y la preparación adecuada de alimentos y bebidas de frutas (14).

Por otra parte, la constatación de 40 casos asociados al brote de la enfermedad exige que los médicos contratados para las actividades de prevención y promoción afinen su habilidad para la sospecha clínica.

Para prevenir la contaminación de alimentos o bebidas por vectores domiciliarios, peridomiciliarios o selváticos en las zonas rurales, es esencial que, además de las medidas habituales para su control, se mantengan limpias las zonas periféricas de las casas, se evite la presencia de roedores y otros animales que sirven de reservorios, y se mejoren las viviendas rurales que siguen teniendo techos de palma y paredes de adobe (14).

### Agradecimientos

Los autores agradecen al personal de salud del Centro Nacional de Enlace y de la Subdirección de

Enfermedades Transmisibles, línea de Enfermedades de Transmisión Vectorial-Zoonosis del Ministerio de Salud y Protección Social, a los Laboratorios de Parasitología y Entomología del Instituto Nacional de Salud y a la Red Chagas Colombia.

### Financiación

Con los recursos de la Secretaría de Salud Departamental del Casanare para vigilancia epidemiológica y de salud pública, del Instituto Nacional de Salud y del Ministerio de Salud y Protección Social se cubrieron los gastos de viaje de los profesionales a la zona afectada y el Instituto aportó, asimismo, la realización de las pruebas moleculares.

### Conflicto de intereses

Los autores del presente artículo declaran no tener conflicto de intereses.

### Referencias

- Organización Panamericana de la Salud.** Guía para vigilancia, prevención, control y manejo clínico de la enfermedad de Chagas aguda transmitida por alimentos. Río de Janeiro: PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS; 2009. p. 92.
- Toso MA, Vial UF, Galanti N.** Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev Med Chile.* 2011;139:258-66. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872011000200017>
- Organización Mundial de la Salud.** Control de la enfermedad de Chagas. Ginebra: OMS; 2003. p. 117.
- Punukollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC.** Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol.* 2007;115:279-83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2006.03.004>
- Díaz ML, González CI.** Enfermedad de Chagas aguda: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. *Rev Univ Ind Santander Salud.* 2014;46:177-88.
- Alarcón de Noya B, Colmenares C, Díaz-Bello Z, Ruiz-Guevara R, Medina K, Muñoz-Calderón A, et al.** Orally-transmitted Chagas disease: Epidemiological, clinical, serological and molecular outcomes of a school microepidemic in Chichiriviche de la Costa, Venezuela. *Parasite Epidemiol Control.* 2016;1:177-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parepi.2016.02.005>
- Alarcón de Noya B, Noya-González O.** An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Trop.* 2015;151:94-102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.004>
- Alarcón de Noya B, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Díaz-Bello Z, Noya O.** La transmisión oral de la enfermedad de Chagas. *Revista de la Facultad de Medicina.* 2010;33:78-86.
- Benchimol-Barbosa PR.** The oral transmission of Chagas' disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int J Cardiol.* 2006;112:132-3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2005.11.087>
- Camandaroba EL, Pinheiro Lima CM, Andrade SG.** Oral transmission of Chagas disease: Importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002;44:97-103. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652002000200008>
- Dias JC.** Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermedades transmitidas por alimentos. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39:370-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822006000400010>
- Mendoza I.** Arritmias en la enfermedad de Chagas aguda por transmisión oral. *Revista Guatemalteca de Cardiología.* 2013;23:S22-3.
- Alarcón de Noya B, Díaz-Bello A, Colmenares C, Zavala-Jaspe R, Mauriello L, Díaz MP, et al.** Transmisión urbana de la enfermedad de Chagas en Caracas, Venezuela: aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. *Rev Biomed.* 2009;20:158-64.
- Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Muñoz-Calderón A, et al.** Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: Epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110:377-86. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760140285>
- Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, et al.** Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis.* 2010;201:1308-15. <http://dx.doi.org/10.1086/651608>
- Añes N, Crisante G, Rojas A, Dávila D.** Brote de enfermedad de Chagas aguda de posible transmisión oral en Mérida, Venezuela. *Bol Mal Salud Amb.* 2013;LIII:1-11.
- Bastos CJ, Aras R, Mota G, Reis F, Dias JP, de Jesus RS, et al.** Clinical outcomes of thirteen patients with acute Chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e711. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000711>
- Beltrao H de B, Cerroni M de P, Freitas DR, Pinto AY, Valente Vda C, Valente SA, et al.** Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Pará State, Brazil, in 2007. *Trop Doct.* 2009;39:231-2. <http://dx.doi.org/10.1258/td.2009.090035>
- Benítez JA, Araújo B, Contreras K, Rivas M, Ramírez P, Guerra W, et al.** Urban outbreak of acute orally acquired Chagas disease in Táchira, Venezuela. *J Infect Dev Ctries.* 2013;7:638-41. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.3620>
- Dias JP, Bastos C, Araújo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, Grassi F, et al.** Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41:296-300. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822008000300014>
- Muñoz-Calderón A, Díaz-Bello Z, Valladares B, Noya O, López MC, Alarcón de Noya B, et al.** Oral transmission of Chagas disease: Typing of *Trypanosoma cruzi* from five outbreaks occurred in Venezuela shows multiclonal and common infections in patients, vectors and reservoirs. *Infect Genet Evol.* 2013;17:113-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.036>

22. **Nobrega AA, García MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al.** Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:653-5. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1504.081450>
23. **Santalla J, Oporto P, Espinoza E, Ríos T, Brutus L.** Primer brote reportado de la enfermedad de chagas en la Amazonia boliviana: reporte de 14 casos agudos por transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* en Guayaramerín, Beni-Bolivia. *BIOFARBO.* 2011;19:52-8.
24. **Segovia M, Carrasco HJ, Martínez CE, Messenger LA, Nessi A, Londono JC, et al.** Molecular epidemiologic source tracking of orally transmitted Chagas disease, Venezuela. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:1098-101. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1907.121576>
25. **Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, et al.** Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1991;33:351-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651991000500003>
26. **Souza-Lima R de C, Barbosa M, Coura JR, Arcanjo AR, Nascimento Ada S, Ferreira JM, et al.** Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46:510-4. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-1367-2013>
27. **Cáceres D, Nicholls RS, Corredor A, Gualdrón L, Slait E, Dib J.** Investigación de un brote de síndrome febril con miocarditis aguda en Guamal, Magdalena. *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 1999;4:170-8.
28. **Hernández LM, Ramírez AN, Cucunubá Z, Zambrano P.** Brote de Chagas agudo en Lebrija, Santander, 2008. *Revista Observatorio de Salud Pública de Santander.* 2009;4:28-36.
29. **Nicholls RS.** Enfermedad de Chagas como enfermedad transmitida por alimentos: la experiencia colombiana. En: Organización Panamericana de la Salud, editor. Informe de la consulta técnica en epidemiología, prevención y manejo de la transmisión de la enfermedad de Chagas como enfermedad transmitida por alimentos. Río de Janeiro: OPS/OMS; 2006. p. 13-4.
30. **Ríos JF, Arboleda M, Montoya AN, Alarcón EP, Parra-Henao GJ.** Probable brote de transmisión oral de enfermedad de Chagas en Turbo, Antioquia. *Biomédica.* 2011;31:185-95. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v31i2.302>
31. **Soto H, Tibaduiza T, Montilla M, Triana O, Suárez DC, Torres-Torres M, et al.** Investigación de vectores y reservorios en brote de Chagas agudo por posible transmisión oral en Aguachica, Cesar, Colombia. *Cad Saúde Pública.* 2014;30:746-56. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00024013>
32. **Zambrano P.** Estudio de casos y controles para establecer asociación entre consumo de alimentos potenciales fuente de infección en los brotes de Chagas agudo de posible transmisión oral en el departamento de Santander, Colombia, 2008-2009. Bogotá, D.C.: Universidad Nacional de Colombia; 2010.
33. **Zambrano P, Cucunubá Z, Montilla M, Flórez C, Parra E, Cortés L, et al.** Brotes de síndrome febril asociado a miocarditis aguda chagásica de posible transmisión oral en el departamento de Santander, diciembre de 2008 a mayo de 2009. *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 2010;10:17-32.
34. **Rueda K, Trujillo JE, Carranza JC, Vallejo GA.** Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. *Biomédica.* 2014;34:631-41. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i4.2204>
35. **Instituto Nacional de Salud.** Protocolo de vigilancia y control de enfermedad de Chagas. Enero 18 de 2012. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2012.
36. **Instituto Nacional de Salud.** Lineamientos 2014 para la prevención, vigilancia y control en salud pública. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2013.
37. **Alcaldía de Paz de Ariporo.** Nuestro municipio. Fecha de consulta: 11 de abril de 2014. Disponible en: <http://www.pazdeariporo-casanare.gov.co/nuestromunicipio.shtml?apc=mlxx-1-&m=f>
38. **Concejo Municipal de Paz de Ariporo.** Acuerdo 010 de 2000 de 30 de junio de 2000. Acuerdo por el cual se adopta el Plan Básico de Ordenamiento Territorial "Paz de Ariporo el gran emporio agroindustrial, ganadero y de desarrollo social de la Orinoquía". Paz de Ariporo: Alcaldía Municipal de Paz de Ariporo Casanare; 2000.
39. **Ministerio de la Protección Social.** Resolución 0951 de 2002 de 18 de julio de 2002. Resolución por la cual se fijan algunos lineamientos en relación con el Registro Individual de Prestación de Servicios de Salud, RIPS. Bogotá, D.C.: Ministerio de la Protección Social; 2002.
40. **Ministerio de la Protección Social.** Resolución 3774 de 2000 del 22 de diciembre de 2000. Resolución por la cual se reglamentan los datos básicos que deben reportar los prestadores de servicios de salud y las Entidades Administradoras de Planes de Beneficios sobre los servicios de salud prestados. Bogotá, D.C.: Ministerio de la Protección Social; 2000.
41. **Departamento Administrativo Nacional de Estadística, Dirección de Planeación, Estandarización y Normalización (DIRPEN).** Metodología de la Clasificación Internacional Uniforme de Ocupaciones Adaptada para Colombia. Bogotá, D.C: Imprenta Nacional; 2009. p. 62.
42. **Instituto Nacional de Salud.** Guía para la vigilancia por laboratorios de la enfermedad de Chagas. Bogotá, D.C.: INS; 2014.
43. **Duffy T, Cura CI, Ramírez JC, Ábate T, Cayo NM, Parrado R, et al.** Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2000. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002000>
44. **Angulo VM, Esteban L.** Nueva trampa para la captura de triatominos en hábitats silvestres y peridomésticos. *Biomédica.* 2011;31:264-8. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v31i2.301>
45. **Angulo VM, Esteban L, Urbano P, Hincapié E, Núñez LA.** Comparación de métodos para la captura de triatominos (Hemiptera: Reduviidae) en palmas *Attalea butyracea* en los Llanos Orientales de Colombia. *Biomédica.* 2013;33:653-59. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i4.835>
46. **Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud.** Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de la enfermedad de Chagas. Bogotá, D.C.: Ministerio de la Protección Social; 2010. p. 80.

47. **Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud.** Guía protocolo para la vigilancia en salud pública de Chagas. Bogotá, D.C: Instituto Nacional de Salud; 2010. p. 48.
48. **Congreso de Colombia.** Ley 1562 de 2012, 11 de julio de 2012. Ley por la cual se modifica el sistema de riesgos laborales y se dictan otras disposiciones en materia de salud ocupacional. Bogotá, D.C.: Congreso de la República; 2012.
49. **Presidencia de la República de Colombia.** Decreto 3075 de 1997 del 23 de diciembre de 1997. Decreto por el cual se reglamenta parcialmente la Ley 9 de 1979. Bogotá, D.C.: Presidencia de la República; 1997.
50. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Resolución 2674 de 2013 del 22 de julio de 2013. Resolución por la cual se reglamenta el artículo 126 del Decreto-ley 019 de 2012 y se dictan otras disposiciones. Bogotá, D.C.: Ministerio de Salud y Protección Social; 2013.
51. **Ministerio de Salud.** Resolución 008430 de 1993 del 4 de octubre de 1993. Resolución por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Bogotá, D.C.: Ministerio de Salud; 1993.
52. **Muñoz F, López-Acuña D, Halverson P, Guerra-de Macedo C, Hanna W, Larrieu M, et al.** Las funciones esenciales de la salud pública: un tema emergente en las reformas del sector salud. *Rev Panam Salud Pública.* 2000;8:126-34. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892000000700017>
53. **Ministerio de la Protección Social.** Decreto 3518 de 2006 del 9 de octubre de 2006. Decreto por el cual se crea y reglamenta el Sistema de Vigilancia en Salud Pública y se dictan otras disposiciones. Bogotá, D.C.: Ministerio de la Protección Social; 2006.
54. **Ministerio del Trabajo.** Decreto 1072 de 2015 del 26 de mayo de 2015. Decreto por medio del cual se expide el Decreto Único Reglamentario del Sector Trabajo. Bogotá, D.C.: Ministerio del Trabajo; 2015.
55. **Dib J.** Enfermedad de Chagas en las comunidades indígenas de la Sierra Nevada de Santa Marta. Bogotá, D.C.: Ediciones Cinescolor Ltda.; 2011. p. 66.
56. **Organización Panamericana de la Salud.** Misión de la OPS verifica interrupción de la transmisión vectorial domiciliar de la enfermedad de Chagas, en 10 municipios de Boyacá y Santander: OPS/OMS; 2013. Fecha de consulta: 18 de octubre de 2015. Disponible en: [http://www.paho.org/col/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1935:mision-de-la-ops-verifica-interrupcion-de-la-transmision-vectorial-domiciliar-de-la-enfermedad-de-chagas-en-10-municipios-de-boyaca-y-santander-&catid=392&Itemid=487](http://www.paho.org/col/index.php?option=com_content&view=article&id=1935:mision-de-la-ops-verifica-interrupcion-de-la-transmision-vectorial-domiciliar-de-la-enfermedad-de-chagas-en-10-municipios-de-boyaca-y-santander-&catid=392&Itemid=487).
57. **Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud.** Guía para la atención clínica integral del pacientes con enfermedad de Chagas. Bogotá: Ministerio de la Protección Social; 2010. p. 81.
58. **Instituto Nacional de Salud.** Protocolo de vigilancia en salud pública Enfermedades transmitidas por alimentos. PRO-R-2.001. Versión 01. Bogotá, D.C: Instituto Nacional de Salud; 2014.
59. **Ministerio de la Protección Social, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, Organización Panamericana de la Salud.** Lineamientos nacionales para la aplicación y el desarrollo de las Estrategias Entornos Saludables. Escuela Saludable y Vivienda Saludable. Bogotá, D.C.: Nuevas Ediciones Ltda.; 2006. p. 115.
60. **Guhl F.** Estado actual del control de la enfermedad de Chagas en Colombia. *Medicina (Buenos Aires).* 1999;59:103-16.

ORIGINAL ARTICLE

## Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage in Ecuador

Patricia Jiménez<sup>1,2</sup>, Karina Calvopiña<sup>1</sup>, Diana Herrera<sup>1</sup>, Carlos Rojas<sup>3</sup>, Laura Pérez-Lago<sup>4,5,6</sup>, Marcelo Grijalva<sup>1</sup>, Remedios Guna<sup>2</sup>, Darío García-de Viedma<sup>4,5,6</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí, Ecuador

<sup>2</sup> Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, España

<sup>3</sup> Hospital "Alli Causai", Ambato, Ecuador

<sup>4</sup> Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", Madrid, España

<sup>5</sup> Instituto de Investigación Sanitaria "Gregorio Marañón", Madrid, España

<sup>6</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades respiratorias (CIBERES), Madrid, España

**Introduction:** *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage isolates are considered to be especially virulent, transmissible and prone to acquire resistances. Beijing strains have been reported worldwide, but studies in Latin America are still scarce. The only multinational study performed in the region indicated a heterogeneous distribution for this lineage, which was absent in Chile, Colombia and Ecuador, although further studies found the lineage in Chile and Colombia.

**Objective:** To search for the presence of the Beijing lineage in Ecuador, the only country in the region where it remains unreported.

**Materials and methods:** We obtained a convenience sample (2006-2012) from two hospitals covering different populations. The isolates were genotyped using 24-MIRU-VNTR. Lineages were assigned by comparing their patterns to those in the MIRU-VNTRplus platform. Isolates belonging to the Beijing lineage were confirmed by allele-specific PCR.

**Results:** We identified the first Beijing isolate in Ecuador in an unexpected epidemiological scenario: A patient was infected in the Andean region, in a population with low mobility and far from the borders of the neighboring countries where Beijing strains had been previously reported.

**Conclusion:** This is the first report of the presence of the Beijing lineage in Ecuador in an unusual epidemiological context that deserves special attention.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis; case reports; virulence; molecular epidemiology; Ecuador.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3450>

### Detección de *Mycobacterium tuberculosis*, linaje Beijing, en Ecuador

**Introducción.** Los aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* pertenecientes al linaje Beijing se consideran especialmente virulentos y transmisibles, y con mayor tendencia a la adquisición de resistencia. El linaje Beijing se ha reportado en todo el mundo; sin embargo, en Latinoamérica los estudios al respecto son más escasos. En el único estudio multinacional llevado a cabo en la región, se detectó una distribución heterogénea del linaje, y no se le encontró en Chile, Colombia y Ecuador, aunque en estudios nacionales posteriores se identificaron aislamientos en Chile y Colombia.

**Objetivo.** Rastrear la presencia del linaje Beijing de *M. tuberculosis* en Ecuador, único país en la región en el que aún no se reporta.

**Materiales y métodos.** Se analizó una muestra de conveniencia (2006-2012) en dos hospitales que atendían poblaciones diferentes. La genotipificación de los aislamientos de *M. tuberculosis* se hizo mediante la plataforma 24-MIRU-VNTR. La asignación de linajes se hizo mediante la comparación de los patrones genotípicos con los incluidos en la plataforma MIRU-VNTRplus, y aquellos pertenecientes al linaje Beijing fueron confirmados mediante reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo.

#### Author's contributions:

Patricia Jiménez, Marcelo Grijalva, Remedios Guna, Darío García-de Viedma: study conception and design

Patricia Jiménez, Karina Calvopiña, Diana Herrera, Laura Pérez-Lago, Carlos Rojas: data collection, analysis and interpretation

Patricia Jiménez, Diana Herrera, Marcelo Grijalva, Darío García-de Viedma: article drafting

All authors revised and approved the final version before article submission.

**Resultados.** Se detectó el primer aislamiento Beijing en Ecuador, en una circunstancia epidemiológica inesperada: un paciente de la región andina, proveniente de una comunidad con escasa movilidad y alejada de las fronteras con los países limítrofes, Perú y Colombia, en los que ya se han identificado aislamientos de *M. tuberculosis* pertenecientes al linaje Beijing.

**Conclusiones.** En este trabajo se reporta por primera vez la presencia del linaje Beijing de *M. tuberculosis* en Ecuador en un contexto epidemiológico inusual que merece especial atención.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis; informes de casos; virulencia; epidemiología molecular; Ecuador.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3450>

Tuberculosis remains a major health concern in many countries and regions around the world. Data from the World Health Organization report an incidence of 54 cases per 100,000 inhabitants and a prevalence of 78 cases per 100,000 inhabitants in Ecuador (1).

The genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates is a valuable aid in the study of transmission patterns of the disease. Genotyping techniques are useful for the identification of isolate clusters, and they provide researchers and clinicians with a better understanding of the transmission dynamics of this pathogen in different settings (2-4), allowing the differentiation of *M. tuberculosis* lineages as well. Some of them, such as the Beijing lineage, are considered to be more "successful" due to their virulence, transmissibility and acquisition of resistance (5,6).

The Beijing family belongs to the East Asian lineage (lineage 2) and is considered to have emerged 6,600 years ago in northeast China, Korea and Japan. Migration movements have expanded the Beijing lineage around the world, with the highest prevalence currently found in Central Asia, the Black Sea area, Russia, Eastern Europe, and South Africa; however, in other areas, such as North America, its prevalence is low (7).

Many studies have focused on the analysis of the Beijing lineage in high prevalence areas, whereas studies in other areas of the world such as Latin America are still scarce. One of the few multinational studies in this region revealed a heterogeneous distribution of the Beijing lineage in the seven countries surveyed (8). In the four countries where it was

detected, its prevalence varied widely: Perú (5.9%), Argentina (1.0%), Brazil (0.8%) and Paraguay (0.6%). In the remaining three countries (Chile, Colombia and Ecuador) no Beijing isolates were identified. Subsequent nationwide studies, however, found Beijing lineage isolates in Colombia and Chile (9-11). Ecuador is the only country among those considered in the study where this lineage had not been reported yet.

The aim of our study was to look for the presence of the Beijing lineage in Ecuador based on regional epidemiology indicating its presence in Colombia and Perú, both bordering countries with Ecuador.

## Materials and methods

### Clinical isolates

We obtained a convenience sample of 28 *M. tuberculosis* isolates (2006-2012) from independent cases diagnosed in two teaching hospitals: The "Alli Causai" Hospital (Ambato, Tungurahua), which serves three provinces in the Ecuadorian Sierra region, and the "Carlos Andrade Marín" Hospital (Quito, Pichincha), a third level referral hospital.

### Microbiological procedures

Following culture in Löwenstein-Jensen medium, *M. tuberculosis* isolates from pulmonary and extra-pulmonary specimens were obtained (table 1). Culture and susceptibility testing were performed by experienced hospital laboratory staff at participating hospitals based on standard methods. Isolates in Löwenstein-Jensen medium were stored under standard conditions in hospital microbiology laboratories.

### Molecular procedures

**DNA extraction.** *Mycobacterium tuberculosis* isolates were resuspended in Tris HCl-EDTA (TE) and inactivated by boiling at 95°C for 45 minutes. DNA was purified following standard procedures (12).

**Lineage identification by MIRU-VNTR analysis.** The isolates were genotyped by MIRU-VNTR (24-loci) based on the simplex-PCR format followed by allelic

Corresponding author:

Patricia Jiménez, Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Av. General Rumiñahui s/n., Sangolquí, Ecuador  
Teléfono: (593) (02) 398 9400, extensión 2111  
[apjimenez@espe.edu.ec](mailto:apjimenez@espe.edu.ec)

Received: 19/07/16; accepted: 01/09/16

**Table 1.** Geographic origin, type of specimen and susceptibility profiles for *Mycobacterium tuberculosis* isolates

Province	Type of specimen			Drug susceptibility			
	Respiratory	Extra-respiratory	N/D	Monoresistant		Poliresistant	MDR
				INH	RMP	INH /SM	INH / RMP
Bolívar	1						
Cotopaxi	10	1		2	1		
Imbabura	6						
Pichincha		2					
Sucumbíos	3					1	2
Tungurahua	4						
			1				

INH: isoniazid; RMP: rifampicin; SM: streptomycin; N/D: no data

discrimination through agarose gel electrophoresis of the PCR products (12). Lineages for the isolates were assigned by comparing their MIRU-VNTR patterns with those in the MIRU-VNTR plus platform (<http://www.miru-vntrplus.org/>) (13,14).

**Analysis of lineage-specific SNP.** Lineage identification from comparative analysis in the MIRU-VNTR plus platform was confirmed by the identification of lineage-specific SNP (15) using PCR and DNA sequencing. A lineage 2 isolate corresponded to the Beijing lineage, and the lineage was confirmed by Beijing allele-specific SNP [Rv2154724 (G526A)] PCR.

**Phylogenetic analysis.** MIRU-VNTR data were analyzed with the software packages available at [www.miruvntrplus.org](http://www.miruvntrplus.org). A dendrogram based on these data was constructed using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA). Isolates showing 100% identity were considered clustered.

### Ethical considerations

The study was approved by the participating hospitals ethics committees.

### Results

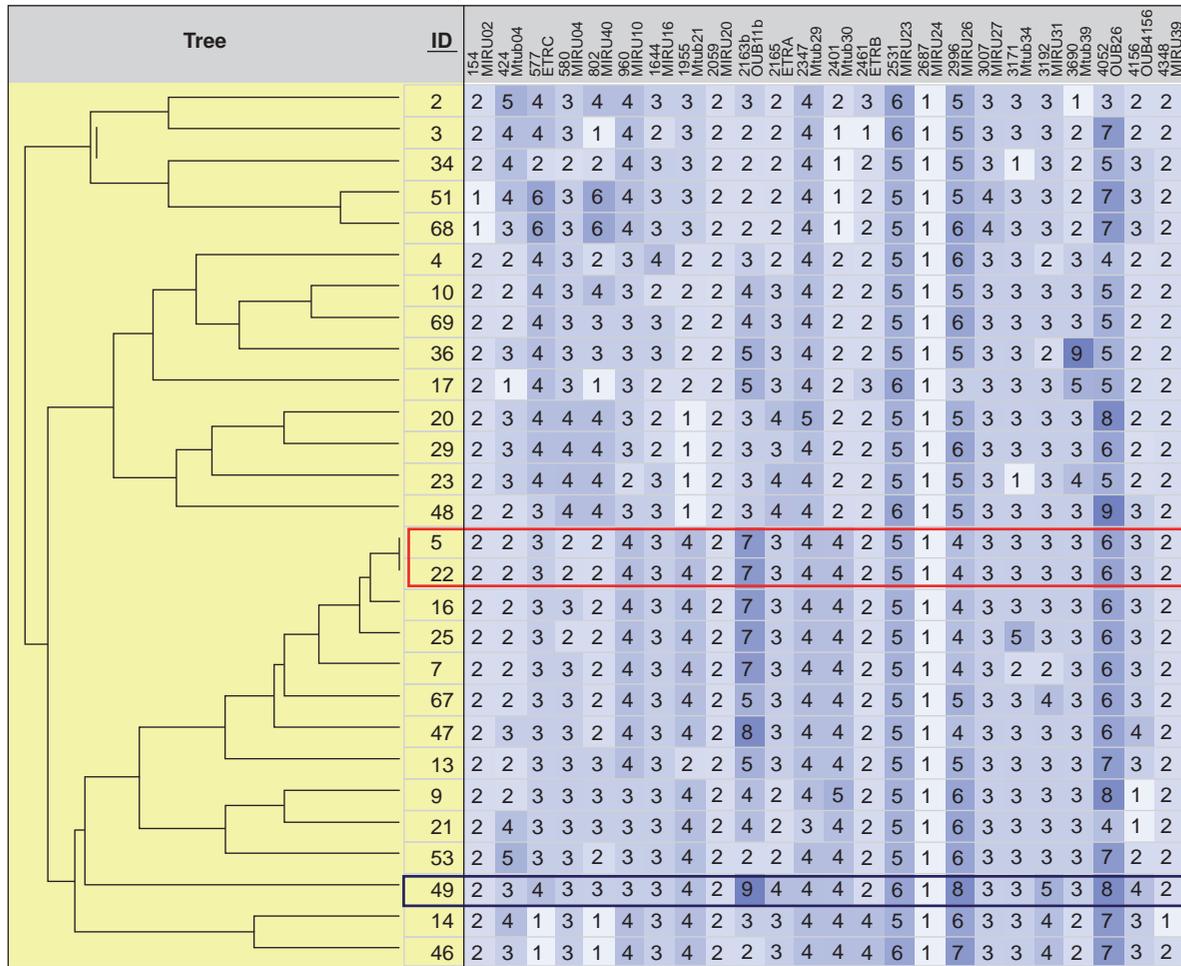
Our convenience sample included 28 isolates from six provinces in Ecuador. Six isolates were resistant, of which two were MDR (table 1). Twenty seven different VNTR genotypes were detected among the 28 MTB isolates genotyped. Two isolates from the Sucumbíos province (isolate 5 with INH-SM resistant phenotype and isolate 22 with INH-RMP resistant phenotype) were clustered into one separate cluster (figure 1). Lineages for the 28 isolates were determined based on the MIRU-VNTR data. From these 28 isolates, 27 clustered to the MIRU-VNTRplus lineage 4 (Euro-American) entrances. The remaining isolate from the Cotopaxi province (isolate 49, susceptible phenotype)

grouped together with the lineage 2 entrances in the database. A second analysis based on the determination of lineage-specific SNP confirmed our MIRU-VNTR-based lineage assignment as lineage 2 Beijing for isolate 49.

### Discussion

The detection of certain *M. tuberculosis* lineages in different geographic areas should rely on consistent sampling to ensure population-based representativeness. Unfortunately, these features are not easily found in all settings, and convenience samples are thus used for these purposes. The Beijing lineage was absent in isolates from Chile, Ecuador and Colombia in a study conducted in several Latin American countries from 1997 to 2003 (8). However, it might have remained undetected due to limitations in the study's sample representativeness. Subsequent nation-wide studies of *M. tuberculosis* lineages demonstrated the Beijing lineage in Colombia (10), where the first case of multidrug-resistant tuberculosis by a rare Beijing strain was reported, and more recently, in Chile (9,11), where Beijing strains were found in isolates from Santiago.

Ecuador remained the only country in Latin America among those included in the multinational study not reporting the Beijing lineage. Perú and Colombia, the two countries that share a border with Ecuador, had communicated the presence of this lineage with a high prevalence in certain settings (16,17). This information led to the consideration that limitations in sample size could be responsible for the lack of detection of Beijing isolates in Ecuador. More importantly, the Beijing lineage was initially assumed to be associated with resistance, but this association has not been found on a global context. The Ecuadorian sample in the above multinational study included MDR isolates exclusively, and those included in the study corresponded to a single site



**Figure 1.** Phylogenetic tree and dendrogram based on the 24-locus-MIRU-VNTR analysis in MIRU-VNTRplus. The two clustered isolates from Sucumbíos province (isolates 5 and 22) and the Beijing isolate (isolate 49) are indicated within the red and blue boxes, respectively.

in Quito (18). In our opinion, including multidrug-resistant tuberculosis isolates from only one site severely limited the study.

To minimize these potential biases, in this study we adopted a less restrictive approach. Isolates from six different Ecuadorian provinces, including susceptible isolates, were collected. As a result, we succeeded in identifying the Beijing lineage in the country. It is interesting to note that we were able to detect one isolate even in a small sample. However, more extensive studies are needed to know the true prevalence of the Beijing lineage in Ecuador.

Although the Beijing lineage has been reported in Perú and Colombia, isolates from Ecuadorian provinces near these countries do not belong to this lineage. Unexpectedly, the Beijing isolate corresponded to a patient from Cotopaxi, a non-touristic, agriculture-based Andean province. The

population in this province has low mobility and little interaction with other regions. We were not able to obtain additional information from the patient infected with the Beijing strain. In this sense, it may be necessary to actively search for new cases that may reveal an unexpected epidemiological scenario for this lineage in Ecuador.

Only two isolates from our collection were clustered. It is interesting that they were both from the Sucumbíos province and they had a resistant phenotype. Although the number of isolates collected was low, transmission of resistant strains in this province deserves attention.

This is the first report of the presence of the Beijing lineage in Ecuador. The epidemiological context where it was detected is unexpected. Despite the importance of the identification of this lineage in the country, our study was based on the analysis of a

limited collection from a convenience sample and, therefore, it should be expanded to help determine the prevalence of the Beijing lineage and clarify whether a peculiar epidemiological scenario is associated with its presence in Ecuador.

### Acknowledgements

We thank Rachid Seqqat for proof reading the manuscript. Diana Herrera was supported by a grant from the Student Mobility Program of the Universidad de las Fuerzas Armadas, ESPE, Ecuador. We acknowledge Dr. Fernando Romero, Head of the Microbiology Laboratory of the “Carlos Andrade Marín” Hospital, for kindly supplying the clinical isolates.

### Conflicts of interest

The authors report no conflicts of interest.

### Funding

This research was funded by the Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, SENESCYT, Ecuador, and by ISCIII FIS grant (15/01554) and cofunded by ERDF (FEDER) Funds from the European Commission: “A way of making Europe”. LP-L was supported by M. Servet CP15/00075.

### References

1. **World Health Organization.** Global Tuberculosis Report 2015. Accessed on: August 18, 2016. Available at: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/).
2. **Barletta F, Otero L, de Jong B, Iwamoto T, Arikawa K, Vander Stuyft P, et al.** Predominant *Mycobacterium tuberculosis* families and high rates of recent transmission among new cases are not associated with primary multidrug resistance in Lima, Perú. *J Clin Microbiol.* 2015;53:1854-63. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03585-14>
3. **Millán-Lou M, Olle-Goig J, Tortola M, Martín C, Samper S.** Mycobacterial diversity causing multi-and extensively drug-resistant tuberculosis in Djibouti, Horn of Africa. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2016;20:150-3. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.15.0268>
4. **Moonan P, Ghosh S, Oeltmann J, Kammerer J, Cowan L, Navin T.** Using genotyping and geospatial scanning to estimate recent *Mycobacterium tuberculosis* transmission, United States. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:458-65. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1803.111107>
5. **Luo T, Comas I, Luo D, Lu B, Wu J, Wei L, et al.** Southern East Asian origin and coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family with Han Chinese. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112:8136-41. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1424063112>
6. **Wada T, Iwamoto T, Hase A, Maeda S.** Scanning of genetic diversity of evolutionarily sequential *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family strains based on genome wide analysis. *Infect Genet Evol.* 2012;12:1392-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.029>
7. **Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-Frebourg N, Lecher S, Willery E, et al.** Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Lineage. *Nat Genet.* 2015;47:242-9. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.3195>
8. **Ritacco V, López B, Cafrune P, Ferrazoli L, Suffys P, Candia N, et al.** *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patients in South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103:489-92. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000500014>
9. **Meza P, Balcells M, Miranda C, Cifuentes M, Wozniak A, García P.** Presence of Beijing genotype among *Mycobacterium tuberculosis* strains in two centres of the Región Metropolitana of Chile. *Rev Chil Infectol.* 2014;31:21-7. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000100003>
10. **Murcia M, Manotas M, Jiménez Y, Hernández J, Cortés M, López L, et al.** First case of multidrug-resistant tuberculosis caused by a rare “Beijing-like” genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Bogotá, Colombia. *Infect Genet Evol.* 2010;10:678-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2010.03.010>
11. **Lagos J, Couvin D, Arata L, Tognarelli J, Aguayo C, Leiva T, et al.** Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* genotypic lineage distribution in Chile and neighboring countries. *PLoS One.* 2016;12:11:e0160434. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0160434>
12. **Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, et al.** Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4498-510. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01392-06>
13. **Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S.** Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2692-9. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00540-08>
14. **Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D.** MIRU-VNTRplus: A web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:W326-31. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq351>
15. **Stucki D, Malla B, Hostettler S, Huna T, Feldmann J, Yeboah-Manu D.** Two new rapid SNP-typing methods for classifying *Mycobacterium tuberculosis* complex into the main phylogenetic lineages. *PLoS One.* 2012;7:e41253. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041253>
16. **Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, Nakanishi N, Caviedes L, Coronel J.** Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Perú. *PLoS One.* 2012;7:e49651. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0049651>
17. **Nieto L, Ferro B, Villegas S, Mehaffy C, Forero L, Moreira C, et al.** Characterization of extensively drug-resistant tuberculosis cases from Valle del Cauca, Colombia. *J Clin Microbiol.* 2012;50:4185-7. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01946-12>
18. **Glynn J, Whiteley J, Bifani P, Kremer K, van Soolingen D.** Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:843-9. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0805.020002>

ARTÍCULO ORIGINAL

## Purificación parcial de péptidos presentes en el veneno del escorpión *Tityus macrochirus* (Buthidae) y evaluación preliminar de su actividad citotóxica

Clara Andrea Rincón-Cortés<sup>1,2</sup>, Édgar Antonio Reyes-Montaña<sup>1</sup>, Nohora Angélica Vega-Castro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Proteínas, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales - U.D.C.A., Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** El veneno del escorpión posee péptidos con actividad neurotóxica que actúan principalmente en los canales iónicos del sistema nervioso de insectos y mamíferos. También se ha establecido su acción citolítica y anticancerígena, características biológicas que aún no se han explorado en el veneno del escorpión *Tityus macrochirus*.

**Objetivo.** Evaluar si tanto el veneno total de *T. macrochirus* como la fracción de péptidos parcialmente purificados disminuyen el porcentaje de viabilidad de diferentes líneas celulares provenientes de tumores.

**Materiales y métodos.** Mediante métodos cromatográficos, electroforéticos y de ultrafiltración con membranas de Amicon Ultra 0.5<sup>®</sup>, se identificaron y purificaron parcialmente los péptidos del veneno de *T. macrochirus* obtenido mediante estimulación eléctrica. Los ensayos de actividad citotóxica del veneno y de la fracción de péptidos se hicieron en líneas celulares provenientes de tumores con el método colorimétrico de reducción de la sal de tetrazolio (*Mossman's Tetrazole Test*, MTT).

**Resultados.** El veneno de *T. macrochirus* posee péptidos con pesos moleculares entre 3 y 10 kDa, los cuales se purificaron parcialmente mediante ultrafiltración y se evaluaron mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (*Reverse Phase-High Pressure Liquid Chromatography*, RP-HPLC). Los ensayos de citotoxicidad del veneno total de *T. macrochirus* evidenciaron una mayor disminución de la viabilidad en la línea celular PC3 que en las demás líneas celulares evaluadas, en tanto que la fracción parcialmente purificada de péptidos logró disminuir la viabilidad de la línea celular HeLa.

**Conclusión.** Los péptidos del veneno de *T. macrochirus* presentaron actividad citotóxica en algunas de las líneas celulares provenientes de tumores, y se observó algún grado de selectividad frente a ellas.

**Palabras clave:** venenos de escorpión; péptidos/aislamiento y purificación, neoplasias.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3265>

### Partial purification of peptides present in the *Tityus macrochirus* (Buthidae) scorpion venom and preliminary assessment of their cytotoxicity

**Introduction:** Scorpion venom contains peptides with neurotoxic action primarily active on ion channels in the nervous system of insects and mammals. They are also characterized as cytolytic and anticancer, biological characteristics that have not yet been reported for the *Tityus macrochirus* venom.

**Objective:** To assess if the total *T. macrochirus* venom and the fraction of partially purified peptides decrease the viability of various tumor-derived cell lines.

**Materials and methods:** The scorpion venom was collected by electrical stimulation and, subsequently, subjected to chromatography, electrophoresis, and ultrafiltration with Amicon Ultra 0.5<sup>®</sup> membranes for the partial identification and purification of its peptides. The cytotoxic activity of the venom and the peptides fraction trials on tumor-derived cell lines were carried out by the MTT method.

**Results:** The *T. macrochirus* scorpion venom has peptides with molecular weights ranging between 3 and 10 kDa. They were partially purified using the ultrafiltration technique, and assessed by the RP-HPLC method. Cytotoxicity trials with the whole *T. macrochirus* venom showed a higher viability decrease on the PC3 cell line compared to the other cell lines assessed, while the partially purified peptides decreased the HeLa cell line viability.

#### Contribución de los autores:

Clara Andrea Rincón-Cortés: extracción, purificación, caracterización y evaluación citotóxica del veneno obtenido

Édgar Antonio Reyes-Montaña: asesoría, purificación y evaluación del veneno y de las fracciones obtenidas en los procesos de purificación

Nohora Angélica Vega-Castro: asesoría en los temas de purificación y evaluación de citotoxicidad

**Conclusion:** Peptides in the *T. macrochirus* scorpion venom showed cytotoxic activity on some tumor-derived cell lines. We observed some degree of selectivity against other cell lines assessed.

**Key words:** Scorpion venoms; peptides/isolation & purification; neoplasms.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3265>

El veneno de escorpión es una mezcla de enzimas, proteínas, nucleótidos, sales, aminoácidos y péptidos (Ayerbe S, Guerrero-Vargas JA, Rivas-Pava MP. Introducción a la toxicología, importancia en la conservación de especies consideradas peligrosas por ser venenosas. En: Polanco-Ochoa R, editor. Manejo de fauna silvestre en Amazonía y Latinoamérica: selección de trabajos del V Congreso Internacional. Bogotá: CITES-Fundación Natura. 2003. p. 381-5), que poseen características farmacológicas, fisiológicas y bioquímicas, las cuales se han determinado y caracterizado estructural y funcionalmente mediante técnicas bioquímicas, como la cromatografía de exclusión (filtración en gel) (1), el intercambio iónico (2) y la cromatografía de alta resolución (HPLC), entre otras (3,4). La determinación de la secuencia de aminoácidos se hace mediante la degradación de Edman o la espectrometría de masas (5); otras técnicas incluyen ensayos de clonación molecular (6-8).

Los péptidos estudiados hasta la fecha se han clasificado en dos grupos: aquellos unidos por medio de puentes disulfuro (*disulfide-bridged peptides*, DBP) (9-11), y aquellos sin puentes disulfuro (*non-disulfide-bridged peptides*, NDBP) (12,13). Los DBP poseen entre 30 y 70 residuos de aminoácidos y tres o cuatro puentes disulfuro, con un peso molecular entre 4 y 7 kDa, y se caracterizan por tener una estructura alfa-hélice anfipática, similar a otras moléculas con actividad antimicrobiana (10,11). En este grupo se encuentran las neurotoxinas, las cuales actúan principalmente en los canales iónicos de sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ) o calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) del sistema nervioso, bloqueándolos o activándolos, y son las responsables de los síntomas que produce la picadura de escorpión en los mamíferos e insectos (9-11).

Correspondencia:

Édgar Antonio Reyes-Montaña, Grupo de Investigación en Proteínas, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 45 N° 26-85, edificio de Química, Laboratorio 201, Bogotá, D.C., Colombia  
Teléfono: (571) 316 5000, extensión 14470  
[eareyesm@unal.edu.co](mailto:eareyesm@unal.edu.co)

Recibido: 04/03/16; aceptado: 05/09/16

Estos venenos también han servido para el desarrollo de nuevos fármacos contra enfermedades, como las canalopatías, o de herramientas para estudios electrofisiológicos (11-13). Por ejemplo, el péptido TsNP, purificado a partir del veneno de *Tityus serrulaus*, con 21 residuos de aminoácidos, una masa molecular de 2,19 kDa y con un puente disulfuro, se ha propuesto para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (4).

Los NDBP, por su parte, son de interés por sus características estructurales y funcionales, entre las cuales se han determinado sus actividades citolítica, inmunomoduladora, potenciadora de bradicinina, antimicrobiana y anticancerígena (13-16). Pocos péptidos anticancerígenos se han reportado; sin embargo, en el veneno de *T. discrepans* se detectaron las toxinas neopladina 1 y 2, capaces de afectar células de carcinoma de seno humano (SKBR3), uniéndose a su superficie e induciendo la expresión de FasL y Bcl-2 (17). Otro ejemplo son los péptidos TsAP 1 y 2, los cuales han demostrado ser citotóxicos en diversas líneas celulares de cáncer (18).

Esta actividad se ha observado tanto en el veneno de escorpión como en sus péptidos. En general, estas sustancias inhiben el crecimiento celular y la síntesis de ADN, e inducen la apoptosis en células tumorales (16-18). Por ejemplo, el veneno del escorpión *Rhopalurus junceus* es un agente antitumoral en células epiteliales (19,20); el veneno de *Heterometrus bengalensis* induce la apoptosis y posee efectos antiproliferativos en líneas celulares de leucemia humana (21), y los venenos de *Buthus martensii* y *Leirus quinquestratus* actúan como inhibidores del crecimiento de tumores cerebrales primarios y gliomas, respectivamente (22,23).

En este contexto, en el presente estudio se purificaron parcialmente los péptidos presentes en el veneno del escorpión *T. macrochirus* (Pocock, 1897) (figura 1) y se evaluó su capacidad citotóxica en diferentes líneas celulares provenientes de tumores. La hipótesis del trabajo planteaba que la actividad citotóxica del veneno de *T. macrochirus* depende principalmente de aquellos péptidos con un rango de peso molecular entre 3 y 10 kDa. Este es el primer estudio bioquímico del veneno de *T. macrochirus*, especie endémica de Colombia (figura 2).



David A. Hernández-Mora, Bogotá, D.C., Colombia

**Figura 1.** *Tityus macrochirus*, macho adulto de la vereda Placitas del municipio de Fosca, Cundinamarca. Perteneció a la familia Buthidae, género *Tityus*; el género es el más abundante en Colombia y causa el mayor número de casos de escorpionismo en el país.



David A. Hernández-Mora, Bogotá, D.C., Colombia

**Figura 2.** Telsón ubicado en el último segmento del metasoma en donde se encuentra el par de glándulas apocrinas productoras del veneno; termina en un aguijón que es una espina hueca característica de los escorpiones de esta familia.

## Materiales y métodos

### Obtención del veneno

Se recolectaron 13 escorpiones de la especie *T. macrochirus* (24) en el municipio de Choachí, Cundinamarca, bajo el permiso otorgado en el marco de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial, estipulado en el Decreto 1376 de 2013 de la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales, ANLA, del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.

El Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia avaló la realización de este proyecto en el acta 06 del 22 de junio de 2015, en la cual se autorizó la recolección de los animales, su manejo en el laboratorio y la extracción del veneno, así como la manipulación de las líneas celulares en un ambiente de bioseguridad de nivel II.

El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica con 10 a 20 voltios en la parte dorsal y en la glándula productora de veneno de los escorpiones (25) (figura 3). La muestra de veneno se recolectó en tubos Eppendorf, se diluyó con agua desionizada y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (figura 4).

### Cuantificación de los pesos moleculares del contenido proteico del veneno

La proteína total del veneno y la de las fracciones de péptidos purificados se cuantificaron con el método de ácido bicinónico usando albúmina sérica bovina como referencia, según el procedimiento descrito por Smith, *et al.* (26). En la cuantificación se empleó, asimismo, el método de absorción en la siguiente relación:  $[\text{Proteína mg/ml}] = (1,56 \times \text{Abs } 280 \text{ nm}) - (0,76 \times \text{Abs } 260 \text{ nm})$  (27). Sin embargo, debido a la poca cantidad del veneno total y de las fracciones parcialmente purificadas, el método de ácido bicinónico no fue adecuado, pues no permitió recuperar la muestra para ensayos posteriores. El método de absorción se escogió como el más apropiado, ya que se encontró una buena correlación entre este y el uso de ácido bicinónico y, además, permitió reutilizar cada una de las muestras en los ensayos posteriores. Por otra parte, las muestras evaluadas eran traslúcidas y no se observaron interferencias en la región de 220 a 280 nm.

La determinación y estimación de los pesos moleculares de los péptidos del veneno de *T. macrochirus* se hicieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl*



**Figura 3.** Forma de manipulación del escorpión para la extracción del veneno por medio de estimulación eléctrica. La pinza ayuda a no lastimar al escorpión y a evitar accidentes en su manipulación.



**Figura 4.** Gota de veneno producida por el escorpión *Tityus macrochirus* después de la estimulación eléctrica.

*Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE), en condiciones desnaturalizadas, usando geles con 15 % de concentración de acrilamida (T) (28). La tinción se hizo con Instant Blue®, y los geles se analizaron usando el programa Quantity One 4.6.7.

### **Purificación parcial de los péptidos presentes en el veneno**

Teniendo en cuenta los pesos moleculares de algunos péptidos (1,2,4,29), inicialmente se analizó en gel de Bio-Gel P-30®, empleando 12,5 ml de soporte en una columna de 1,0 cm x 2,6 cm. La elución se hizo con solución tampón fosfato salino (PBS) 1X, manteniendo un flujo de 0,3 ml/minuto. El seguimiento de la purificación se hizo mediante lecturas de absorbancia a 220 y 280 nm. De acuerdo con los perfiles obtenidos, se recolectaron las diferentes fracciones y se les determinó la concentración de proteína (26), y se evaluaron por SDS-PAGE (27) y RP-HPLC (1,2,4,29). También se hicieron ensayos de cromatografía de intercambio iónico con DEAE-Sepharosa (1,2). La elución se realizó en forma discontinua, empleando un gradiente de cloruro de sodio (NaCl) a partir de 150 mM y hasta 550 mM en PBS 1X.

Los péptidos también se purificaron parcialmente por ultrafiltración, empleando el sistema de Amicon® Ultra-0,5 y membranas con un tamaño de poro de 10 y 3 kDa. La muestra de veneno total se centrifugó a 12.000 rpm durante 40 minutos en el Amicon® Ultra-0,5 de 10 kDa, el difusato se pasó al Amicon® Ultra-0,5 de 3 kDa y se centrifugó a 12.000 rpm durante 80 minutos. Posteriormente, se determinó la concentración de proteína de cada una de las fracciones obtenidas (difusatos y retentatos) mediante el método de absorción (27), y se evaluaron con RP-HPLC (1,2,4,29).

Se empleó la RP-HPLC en el veneno total y en las fracciones obtenidas con los métodos cromatográficos y de ultrafiltración con Amicon®. Se empleó una columna C18 con dimensiones de 4,6 x 150 mm, un gradiente lineal del solvente B (TFA al 0,05 % en acetonitrilo) de 5 a 50 % en solvente A (ácido trifluoroacético, TFA, al 0,05 % en agua) durante 50 minutos (1-3,5,14,17,29,30).

### **Actividad biológica del veneno total y los péptidos parcialmente purificados**

Con el veneno total se evaluó el grado de citotoxicidad frente a líneas celulares provenientes de células tumorales de colon (HT-29, obtenidas de tejido de colon humano, con morfología epitelial,

de propiedades adherentes, y adenocarcinoma colorrectal) (31); de cuello uterino (SiHA, obtenidas de tejido de cuello uterino humano, con morfología epitelial, de propiedades adherentes, y carcinoma de células escamosas grado II; HeLa, obtenidas de tejido de cuello uterino humano, con morfología epitelial, de propiedades adherentes y adenocarcinoma) (31); de seno (MDA-MB231, obtenidas de tejido de glándula mamaria derivado del lugar de la metástasis, con derrame pleural, morfología epitelial, de propiedades adherentes, y adenocarcinoma) (31); de próstata (PC3, obtenidas de tejido de próstata derivado del sitio de metástasis en hueso de humano, con morfología epitelial, de propiedades adherentes, y adenocarcinoma de grado IV) (31), y de pulmón (A549, obtenidas de tejido de pulmón de humano, con morfología epitelial, de propiedades adherentes y carcinoma) (31). Como control, se empleó una línea celular normal de pulmón con células adherentes del tipo de fibroblastos (MRC-5) (31). El cultivo celular se realizó en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), con 10 % de suero fetal bovino y 1 % de antibiótico-antifúngico a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> (17,32).

Se hicieron ensayos por triplicado sembrando 10.000 células por pozo y dejándolas sincronizar durante 24 horas. La muestra de veneno se sembró en un rango de concentración de 100 a 0 µg/ml. Además, la línea celular HeLa se trató con el veneno total en un rango de concentraciones de 50 a 1 µg/ml; también, se evaluó la fracción de péptidos parcialmente purificados en un rango de 56 a 2,8 µg/ml. En cada línea celular evaluada, se empleó un control con el mismo tratamiento descrito, pero empleando DMEM en lugar de veneno o fracciones en el paso correspondiente (células sin estímulo).

Las células tratadas con estímulo y sin este, se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, y posteriormente se determinó el porcentaje de viabilidad celular usando el método MTT. Se emplearon 20 µl de la solución de MTT con una concentración de 0,5 mg/ml y se adicionaron 200 µl de DMEM en cada pozo. Las placas se incubaron durante tres horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró la solución y se agregaron 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada pozo, se incubó cada placa a 37 °C durante 15 minutos para disolver los cristales formados y se leyó la absorbancia a 540 nm (32).

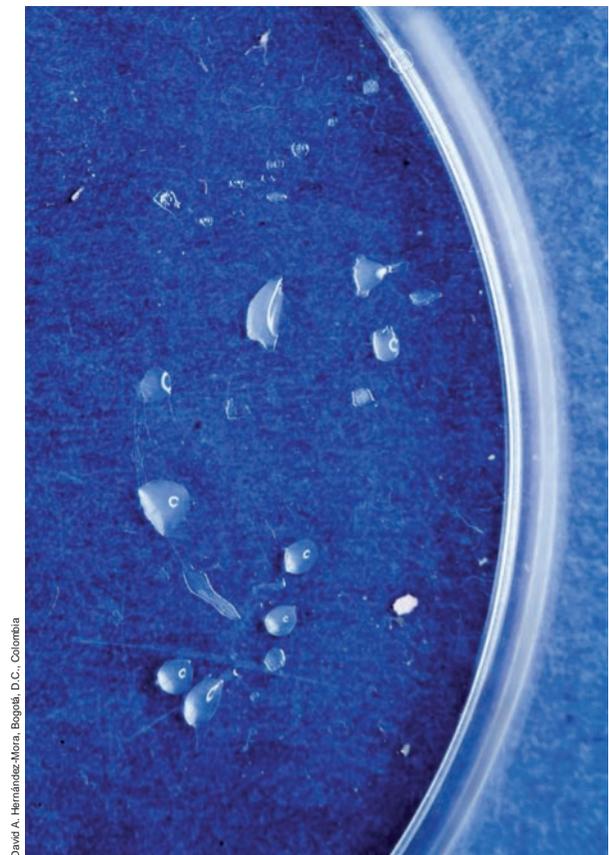
Como control, se emplearon células sin el veneno ni la fracción de péptidos para determinar el 100 % de viabilidad celular. Los datos se analizaron por

regresión y análisis de varianza de un factor mediante ANOVA en cada línea celular, con el paquete estadístico de SPSS® de IBM, considerando un nivel de significación de 0,01.

## Resultados

### **Pesos moleculares del contenido proteico del veneno**

Se recolectaron 200 µl de veneno diluido en agua desionizada proveniente de 13 individuos de *T. macrochirus* después de seis extracciones y un promedio de 3 µl por extracción y por individuo (figura 5), con una concentración de proteína total de 1,75 mg/ml determinada con el método del ácido bicinonínico y 1,87 mg/ml con el método espectrofotométrico. Teniendo en cuenta la proximidad de estos dos valores y dada la poca cantidad de la muestra, se decidió continuar la cuantificación con el método espectrofotométrico y se partió de un valor inicial de muestra de 1,81 mg/ml, correspondiente a la media de las concentraciones obtenidas mediante los dos métodos evaluados; la cantidad inicial de proteína total fue de 360 µg.

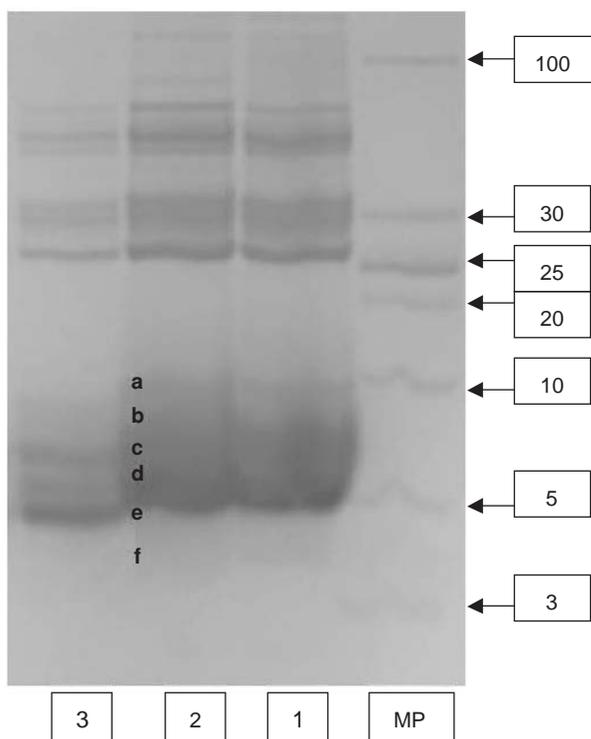


**Figura 5.** Recolección del veneno en una caja de Petri estéril. El volumen aproximado después de cada estímulo es de 3 a 5 µl.

Aplicando el método de electroforesis al veneno total, se observaron proteínas con un peso molecular entre 100 y 27 kDa, y péptidos entre 10 y 3 kDa; en este último rango, se pudieron observar seis bandas correspondientes a pesos moleculares comprendidos entre los 10,5 y los 4,6 kDa, dependiendo de la movilidad electroforética comparada con el patrón de peso molecular (figura 6).

### **Purificación parcial de los péptidos presentes en el veneno**

Considerando los pesos estimados por electroforesis y los resultados reportados por Possani, *et al.* (1), y Pimenta, *et al.* (28), la filtración se hizo en gel Bio-Gel P30. Se sembraron 90 µg de proteína total del veneno y se obtuvieron tres fracciones (figura 7A), de las cuales la primera correspondió al volumen muerto de la columna (3 ml) y, las otras dos, al rango de inclusión de esta: a los 5 ml con una concentración de 0,52 mg/ml y a los 13 ml con una concentración de 0,069 mg/ml. El análisis de cada una de las fracciones con SDS-PAGE y RP-HPLC



**Figura 6.** Electroforesis SDS-PAGE (tris-tricina) de la muestra de veneno total de *T. macrochirus*. Se observa la presencia de polipéptidos y péptidos en el veneno total; los pesos de interés corresponden a péptidos con un rango de 10 a 3 kDa. Carriles 1, 2 y 3: muestras de veneno total con concentración de 18, 1,2 y 0,61 µg, respectivamente. MP: patrón de peso molecular. Las letras a a f representan las bandas de posibles péptidos de interés.

no evidenció bandas ni señales específicas que permitieran determinar la presencia de péptidos en ninguna de ellas (no se muestran los datos).

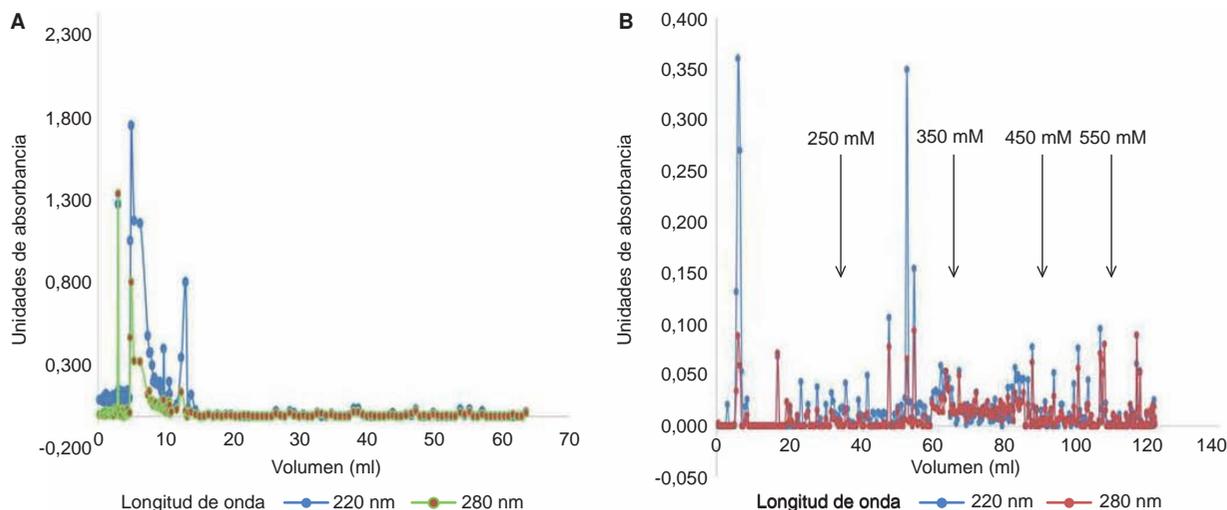
De forma similar, en la cromatografía de intercambio iónico, se sembraron 170 µg de proteína total y se obtuvieron 13 fracciones (figura 7B), aunque solo dos de ellas presentaron una absorbancia significativa (fracciones obtenidas con 150 mM y 250 mM de NaCl en una concentración de 0,62 mg/ml y 0,47 mg/ml, respectivamente).

Por otra parte, al centrifugar 572,48 µg de veneno total en Amicon Ultra-0,5<sup>®</sup> (Bio-Rad), con un tamaño de exclusión de 10 kDa, se obtuvo un difusato con una concentración de proteína de 0,101 mg/ml; este difusato se trató con Amicon Ultra-0,5<sup>®</sup> (Bio-Rad), con un tamaño de exclusión de 3 kDa, y se centrifugó, con lo cual se obtuvieron un retentato con concentración de proteína de 0,28 mg/ml y un difusato de 0,020 mg/ml. Estas fracciones se evaluaron mediante RP-HPLC y se observaron varias señales con el retentato en Amicon Ultra-0,5<sup>®</sup> (Bio-Rad), y con un tamaño de exclusión de 3 kDa, fracción que se denominó VTnP (péptidos del veneno de *T. macrochirus*); 12,5 µg de la fracción VTnP permitieron detectar al menos siete componentes con tiempos de retención de 16,04, 16,83, 16,99, 17,75, 20,46, 21,67 y 22,28 minutos (figura 8), mientras que, con 18 µg de veneno total, se observaron 19 componentes (figura 9).

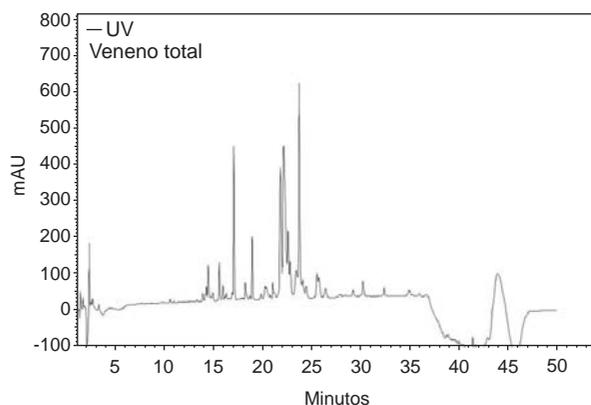
En conclusión, los péptidos presentes en el veneno del escorpión se encontraron en el rango completo de tiempos de retención y no en una zona del perfil cromatográfico obtenido con el veneno total (figuras 8 y 9). Especialmente interesante resultó observar las fracciones obtenidas en los tiempos de retención de 16, 04, 20, 46 y 22, 28 minutos del perfil cromatográfico de la fracción VTnP.

### **Actividad biológica del veneno total y los péptidos parcialmente purificados**

A las 24 horas se observó una disminución en la viabilidad de todas las líneas celulares empleadas, con un mayor efecto en la línea PC3, cuya viabilidad disminuyó a 28 % con 50 µg/ml de veneno total comparada con la de control. En cuanto a la HT-29, su viabilidad con la misma concentración de veneno fue cercana al 50 %. En las otras líneas celulares no se logró un valor de viabilidad igual o menor al 50 % con esta concentración; específicamente para la A549, dicho valor fue cercano a 62 %, seguido de la MDA-MB231 y la SiHa, las cuales presentaron una viabilidad de 73 y 89 % con esta misma concentración de veneno, respectivamente (figura 10).



**Figura 7.** Perfil cromatográfico de una muestra de veneno total de *T. macrochirus* en columna abierta. **A.** Perfil cromatográfico de filtración en gel con soporte de Bio-Gel P30, la línea azul corresponde a la absorbancia de 220 nm y, la verde, a la de 280 nm. **B.** Perfil cromatográfico de intercambio iónico con soporte de DEAE-Sepharosa, la línea azul corresponde a la absorbancia de 220 nm y, la roja, a la de 280 nm. Los valores de 250 mM a 550 mM corresponden a la concentración de NaCl empleada durante la cromatografía.



**Figura 8.** Perfil cromatográfico con RP-HPLC del veneno total de *T. macrochirus*. Se emplearon 0,018 mg de proteína total del veneno en un método lineal en fase inversa a partir de 5 % y hasta 50 % de ACN-0,05 % TFA durante 50 minutos, con detección a 210 nm-UV.

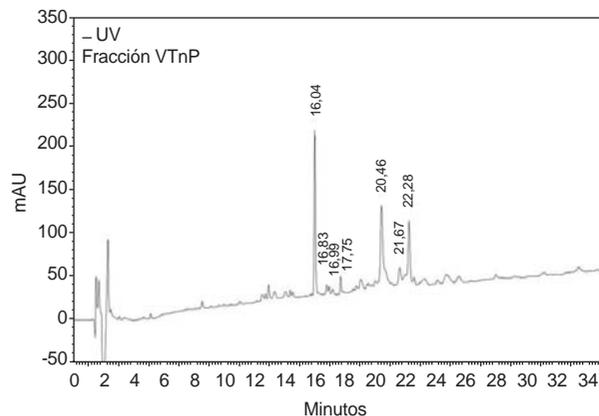
En ensayos previos, se había obtenido una disminución de 20 % en la viabilidad de la línea celular HeLa (80 % de viabilidad) con una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  de veneno total (no se muestran los datos), en tanto que con 56  $\mu\text{g/ml}$  de la fracción VTnP, la viabilidad celular fue de 60 %; en este último caso, la disminución de la viabilidad tuvo una variación lineal con respecto a la concentración de la fracción VTnP utilizada (figura 11).

En el caso de la MRC-5, una línea celular de fibroblastos, la viabilidad se mantuvo por encima del 85 % en las concentraciones usadas, lo cual indicaba que el veneno podría tener efecto sobre células transformadas y no sobre células normales

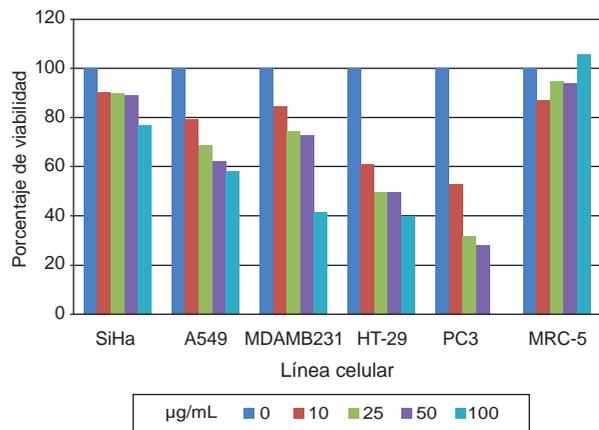
(figura 10). A pesar de existir una diferencia entre el porcentaje de viabilidad obtenido en esta línea celular y los controles de todas las líneas celulares usadas, dicha diferencia no fue significativa (cuadro 1), por lo que se consideró que el veneno no tenía efecto sobre dicha línea celular.

Según el análisis estadístico (cuadro 1), los resultados presentados en la figura 10 evidenciaron una diferencia estadísticamente significativa en todas las concentraciones del veneno usadas en las líneas celulares PC3 y HT29, lo cual indica que incluso la concentración más baja utilizada (10  $\mu\text{g/ml}$ ) afectó su viabilidad celular. En el caso de las líneas MDA-MB31 y A549, la concentración más baja no tuvo un efecto significativo sobre la viabilidad celular, pero al usar 25  $\mu\text{g/ml}$  y concentraciones más altas, se encontraron diferencias significativas indicativas del efecto tóxico del veneno en cada una de estas líneas. Un efecto menor se observó sobre la SiHa, en la cual solamente la concentración más alta (100  $\mu\text{g/ml}$ ) tuvo un efecto significativo sobre la viabilidad celular.

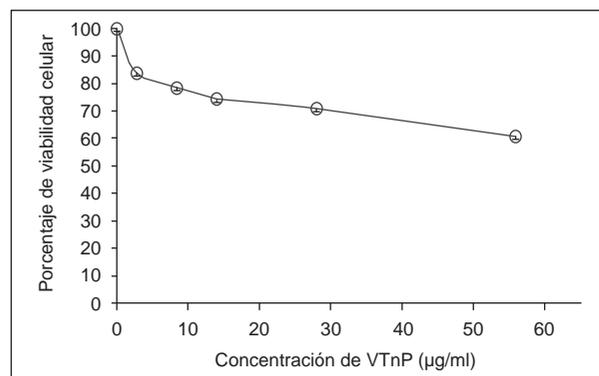
Estos resultados se observaron al comparar el valor obtenido de las líneas celulares de control (sin estímulo) con el de las líneas celulares sometidas al estímulo (cada una de las concentraciones del veneno), partiendo de la hipótesis nula de que el estímulo no tenía efecto sobre la viabilidad de las líneas celulares comparadas con las líneas de control, con un valor de  $p < 0,01$  para rechazar la hipótesis.



**Figura 9.** Perfil cromatográfico con RP-HPLC de la fracción VTnP o retentado obtenido de la ultrafiltración con Amicon Ultra-0,5, con una membrana NMWL de 3 kDa. Se emplearon 0,0125 mg de proteína total con un método lineal en fase inversa a partir de 5 % y hasta 50 % de ANC-0,05 % TFA durante 50 minutos, con detección a 210 nm.



**Figura 10.** Comparación del porcentaje de viabilidad celular de cada línea celular con respecto a la concentración de veneno total de *T. macrochirus* (el análisis estadístico se presenta en el cuadro 1).



**Figura 11.** Efecto de la variación de la concentración de la fracción del péptido parcialmente purificado (VTnP) del veneno de escorpión *T. macrochirus* en la viabilidad de la línea celular HeLa

**Cuadro 1.** Determinación de la significación estadística de los resultados obtenidos en las pruebas de actividad biológica del veneno de *T. macrochirus*. Análisis de varianza de un factor en el cual los valores de  $p < 0,01$  determinaban el efecto del veneno en la viabilidad celular de las líneas ensayadas

Línea celular	Concentración del veneno (µg/ml)				
	0	10	25	50	100
MRC-5	0,219	0,297	0,398	0,471	0,294
SiHa	0,201	0,058	0,061	0,018	<0,01
MDA-MB231	0,209	0,071	<0,01	<0,01	<0,01
A549	0,178	0,011	<0,01	<0,01	<0,01
PC3	0,211	<0,01	<0,01	<0,01	ND
HT29	0,196	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

ND: no se determinó.

**Discusión**

El método de extracción utilizado demostró ser más eficiente que los métodos manuales usados preliminarmente, ya que permitió obtener mayor cantidad de veneno, disminuir el tiempo de manipulación del animal, realizar las extracciones de veneno varias veces en cada individuo y disminuir la posibilidad de contaminación de la muestra obtenida (25). Asimismo, con este método se obtuvo un veneno con un perfil electroforético bien definido (figura 6) y similar a lo reportado para otras especies de escorpiones (1,2,25,29,33).

Los pesos moleculares de los péptidos de interés presentes en el veneno de *T. macrochirus* fluctuaron entre 3,5 y 10 kDa (figura 6), lo cual es característico de otros venenos de escorpiones pertenecientes al mismo género. En general, se ha encontrado que los venenos de escorpiones tienen péptidos con pesos moleculares en un rango de 2 a 14 kDa, y que estos poseen gran similitud entre sus secuencias de aminoácidos (33-35).

Dada la variabilidad reportada previamente de los pesos moleculares y los puntos isoeléctricos de los componentes del veneno de diferentes especies del género *Tityus*, para la purificación de sus péptidos se han usado métodos cromatográficos como la filtración en gel y el intercambio iónico (1,2,29,33), por lo que fueron estos los métodos inicialmente empleados en este estudio. Sin embargo, a pesar de que en los resultados obtenidos se muestran fracciones con una absorbancia significativa (figura 7 A y B), no se lograron detectar péptidos por electroforesis. Es importante mencionar que la cantidad de veneno total usada fue muy poca (90 µg) y que, si se considera la dilución que sufrió la muestra de veneno durante la elución en las cromatografías en columna abierta, se obtuvo muy poca cantidad

de cada una de las fracciones separadas, por lo que muy seguramente se logró un valor menor a la sensibilidad de la tinción empleada (InstantBlue™, 5 ng de proteína).

El método de centrifugación con Amicon Ultra-0,5® se seleccionó debido a su capacidad de separación y concentración dependiendo del tamaño de la biomolécula, el cual viene dado por el tamaño del poro de la membrana utilizada. En este caso, dado que el objetivo era obtener fracciones de péptidos de un tamaño menor de 10 kDa, se usaron dos membranas con un límite de separación entre 3 y 10 kDa. Los resultados obtenidos en el retentado y el difusado con la membrana de 3 kDa (0,448 mg y 0,11 mg, respectivamente), permiten asegurar que el rango de peso molecular de la mayoría de los péptidos encontrados en este veneno fluctuaba entre 3 y 10 kDa.

La RP-HPLC del veneno total (figura 8) presentó señales similares a las obtenidas para otros venenos de escorpiones de la misma familia, las cuales difirieron principalmente en su cantidad, ya que en el presente estudio se detectaron claramente 19 señales y en otros se han reportado más de 20 señales (3,29,34,35). Sin embargo, las señales encontradas entre los 21 y los 25 minutos de retención (figura 8), cuya resolución no fue muy buena, fueron similares a las reportadas con actividad antimicrobiana (35) y anticancerígena (17) en venenos provenientes de escorpiones de la misma familia. Esto podría indicar que algunos péptidos del veneno de *T. macrochirus* tienen un comportamiento similar en la HPLC al de otros ya reportados con actividad biológica.

En cuanto a la fracción VTnP, se obtuvo un perfil cromatográfico (figura 9) similar al del veneno total (figura 8), aunque se evidenció una disminución en el número de señales (siete en total), lo que claramente indica la separación de varios de los componentes del veneno total. Asimismo, en este perfil se observó una mejor separación de algunos de los componentes presentes en el rango de 21 a 25 minutos de retención, lo cual lo relacionaría aún más con péptidos reportados previamente con actividad antimicrobiana o anticancerígena (3,19,29,34,35).

Los resultados evidencian, asimismo, que el método de ultrafiltración con Amicon fue eficiente y selectivo para la purificación parcial de los péptidos del veneno de *T. macrochirus*. También, puede señalarse que los componentes proteicos del veneno de diferentes géneros y especies de escorpión varían en cuanto a

la cantidad de péptidos o proteínas, pero mantienen su similitud estructural (3,5,7,11,28,33-36), lo cual sugeriría una actividad biológica específica en los péptidos del veneno de *T. macrochirus*.

Por último, los ensayos de citotoxicidad se hicieron en líneas celulares provenientes de tumores y en una línea celular sana como control, con el fin de comprobar el efecto del veneno en tumores y su selectividad frente a células de tumor o sanas.

El veneno total de *T. macrochirus* redujo la viabilidad de las cinco líneas celulares provenientes de tumores, con un nivel de significación de  $p < 0,01$ , y las más afectadas fueron las líneas PC3 y HT-29 (figura 10). Resultados similares se han obtenido con el veneno de *T. serrelatus*, con efecto citotóxico comprobado en líneas celulares de cáncer de próstata, pulmón, seno y glioblastomas (18). En este sentido, Guo, *et al.* (18), sintetizaron dos péptidos (TsAP-1 y TsAP-2) presentes en el veneno de *T. serrelatus* y evidenciaron que el primero de ellos tenía mayor citotoxicidad en células de carcinoma de pulmón, en tanto que el segundo tenía mayor efecto en células de cáncer de próstata.

Con base en ello, podría inferirse que en el veneno de *T. macrochirus* podría haber un péptido similar al TsAP-2 de *T. serrelatus*. Estos resultados también tendrían relación con los componentes peptídicos del veneno de *T. discrepans* (17), ya que el veneno de *T. macrochirus* no disminuyó la viabilidad celular en la línea MRC-5, pero sí en las derivadas de carcinoma (figura 10, cuadro 1).

Así, podría predecirse que los componentes peptídicos del veneno de *T. macrochirus* actúan por tres vías diferentes: 1) por bloqueo de un canal específico (37); 2) por inhibición del crecimiento de la célula cancerígena en la unión a un sitio específico diferente al del canal iónico (38), y 3) por activación intracelular de las vías que inducen la apoptosis (39).

Con base en los resultados del presente estudio, el veneno de *T. macrochirus* puede ser selectivo y poseer citotoxicidad diferencial, pues se requirió una concentración diferente de proteína para generar un efecto citotóxico determinado (figura 10). Según lo descrito por otros investigadores, esta es una característica general de diferentes venenos de escorpión: por ejemplo, se ha determinado que el veneno de *Rhopalurus junceus* es selectivo frente a células cancerosas de pulmón (40); la clorotoxina, purificada del veneno de *Leiurus quinquestriatus* (41), es específica para células de glioma (42) y se la ha propuesto como una alternativa para el

reconocimiento de otro tipo de células cancerosas con base en ensayos con nanopartículas que permitieron reconocer ganglios positivos para linfoma de cáncer de mama, próstata y testículo (43,44); el veneno de *Androctonus crassicauda*, por su parte, resultó selectivo para la línea celular BC3H1 (45) (13,17-23,29,45).

Al observar que el veneno de *T. macrochirus* redujo la viabilidad de las células de tumores de cuello uterino (SiHa) en un 50 %, se hizo un nuevo ensayo con otra línea de tumor de cuello uterino (HeLa) (no se muestran los datos), cuyos resultados se asemejan a la actividad del veneno total de *R. junceus* (40), y reafirmarían que el veneno de *T. macrochirus* es selectivo frente a líneas celulares de tumor específicas. Sin embargo, al evaluar el efecto de la fracción peptídica obtenida por la purificación (VTnP) en estas líneas celulares, se encontró que una concentración mayor incrementaba su efecto citotóxico en la línea HeLa (figura 11), lo cual sugiere que la eliminación de ciertos componentes presentes en el veneno total potenciaría el efecto de algunos de los péptidos de la fracción VTnP.

Con base en los resultados descritos, es posible concluir que el componente peptídico del veneno de *T. macrochirus* tuvo actividad citotóxica en las líneas celulares evaluadas, lo cual se ha observado también en péptidos purificados y sintetizados a partir de otros venenos de escorpión, por lo cual se han empezado a considerar como una alternativa para el diseño y la elaboración de nuevos agentes terapéuticos (13,16,18,43-51). De ahí la necesidad de separar completamente algunos de los péptidos de este veneno y evaluar el efecto que cada uno de ellos produce en las diferentes líneas celulares evaluadas para determinar plenamente el responsable de cada uno de los efectos observados.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen relaciones económicas ni personales de ninguna índole que pudieran influenciar su juicio con respecto a los resultados de la presente investigación. Todos los autores tuvieron acceso irrestricto a los datos y no existió participación de agentes externos en el diseño del estudio, ni en la recopilación, el análisis o la interpretación de la información.

### Financiación

Estudio financiado por la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, por convocatoria del Sistema de Información de la Investigación, con el código de proyecto 18970.

### Referencias

1. **Possani LD, Martin BM, Svendsen JB, Rode GS, Erickson BW.** Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus* primary structures and sequence comparison by metric analysis. *Biochem J.* 1985;229:739-50. <http://dx.doi.org/10.1042/bj2290739>
2. **Escobar E, Velásquez L, Rivera C.** Separación e identificación de algunas toxinas del veneno de *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) (Scorpiones: Buthidae). *Rev Perú Biol.* 2003;10:217-20. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v10i2.2507>
3. **Barona J, Batista VF, Zamudio FZ, Gómez-Lagunas F, Wanke E, Otero R, et al.** Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na<sup>+</sup>- and K<sup>+</sup>-channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1764:76-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.08.010>
4. **Alves RS, Ximenes RM, Antonio RC, Nascimento NR, Martins RD, Rabello MM, et al.** Isolation, homology modeling and renal effects of a C-type natriuretic peptide from the venom of the Brazilian yellow scorpion (*Tityus serrulatus*). *Toxicon.* 2013;74:19-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.016>
5. **Ferreira LA, Alves EW, Henriques OB.** Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon.* 1993;31:941-7. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(93\)90253-F](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(93)90253-F)
6. **Dai C, Ma Y, Zhao Z, Zhao R, Wang Q, Wu Y, et al.** Mucroporin, the first cationic host defense peptide from the venom of *Lychas mucronatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:3967-72. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00542-08>
7. **Guerrero-Vargas JA, Moura CB, Quintero-Herna V, Possani LD, Schwartz EF.** Identification and phylogenetic analysis of *Tityus pachyurus* and *Tityus obscurus* novel putative Na<sup>+</sup>-channel scorpion toxins. *PLoS One.* 2012;7:e30478. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030478>
8. **Schwartz EF, Diego-García E, Rodríguez de la Vega RC, Possani LD.** Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). *BMC Genomics.* 2007;8:119. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-8-119>
9. **Chen T, Folan R, Kwok H, O'Kane EJ, Bjourson AJ, Shaw C.** Isolation of scorpion (*Androctonus amoreuxi*) putative alpha neurotoxins and parallel cloning of their respective cDNAs from a single sample of venom. *Regul Pept.* 2003;115:115-21. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-0115\(03\)00146-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-0115(03)00146-0)
10. **Chen T, Walker B, Zhou M, Shaw C.** Molecular cloning of a novel putative potassium channel-blocking neurotoxin from the venom of the North African scorpion, *Androctonus amoreuxi*. *Peptides.* 2005;26:731-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2004.12.002>
11. **Jalali A, Bosmans F, Amininasab M, Clynen E, Cuypers E, Zaremirakabadi A, et al.** OD1, the first toxin isolated from the venom of the scorpion *Odontobuthus doriae* active on voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *FEBS Letters.* 2005;579:4181-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.06.052>
12. **Tytgat J, Chandu KG, García ML, Gutman GA, Martin-Eauclaire MF, van der Walt J, et al.** A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms:

- Alpha-KTx molecular subfamilies. Trends Pharmacol Sci. 1999;20:444-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01398-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01398-X)
13. **Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, Possani LD.** Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*. 2015;93:125-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.11.233>
  14. **Zeng X, Corzo G, Hahin R.** Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life*. 2005;57:13-21. <http://dx.doi.org/10.1080/15216540500058899>
  15. **Zeng XC, Li WX, Peng F, Zhu ZH.** Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpb) related to a bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *IUBMB Life*. 2000;49:207-10. <http://dx.doi.org/10.1080/713803610>
  16. **Almaaytah A, Albalas Q.** Scorpion venom with no disulfide bridges: A review. *Peptides*. 2014;51:35-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2013.10.021>
  17. **D'Suze G, Rosales A, Salazar V, Sevcik C.** Apoptogenic peptides from *Tityus discrepeans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line. *Toxicon*. 2010;56:1497-505. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.09.008>
  18. **Guo X, Ma C, Du Q, Wei R, Wang L, Zhou M, et al.** Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: Evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. *Biochimie*. 2013;95:1784-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.003>
  19. **Díaz A, Morier L, Rodríguez H, Caballero Y.** Citotoxicidad del veneno del escorpión cubano *Rhopalurus junceus* y sus fracciones sobre líneas celulares tumorales humanas. *LABIOFAM*. 2010;1:12-8.
  20. **Rowe AH, Xiao Y, Scales J, Linse KD, Rowe MP, Cummins TR, et al.** Isolation and characterization of CvIV4: A pain inducing  $\alpha$ -scorpion toxin. *PLoS One*. 2011;6:e23520. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023520>
  21. **Das Gupta S, Debnath A, Saha A, Giri B, Tripathi G, Vedasiromoni J, et al.** Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis* Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562. *Leuk Res*. 2007;31:817-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2006.06.004>
  22. **Omran MA.** *In vitro* anticancer effect of scorpion *Leiurus quinquestriatus* and Egyptian cobra venom on human breast and prostate cancer cell lines. *J Med Sci*. 2003;3:66-8. <http://dx.doi.org/10.3923/jms.2003.66.86>
  23. **Wang W, Ji Y.** Scorpion venom induces glioma cell apoptosis *in vitro* and inhibits glioma tumor growth *in vivo*. *J Neurooncol*. 2005;73:1-7. <http://dx.doi.org/10.1007/s11060-004-4205-6>
  24. **Teruel R, García LF.** Rare or poorly known scorpion from Colombia. I. Redescription of *Tityus macrochirus* Pocock, 1897. *Euscorpium*. 2008;63:1-11.
  25. **Oukkache N, Chgoury F, Lalaoui M, Cano A, Ghalim N.** Comparison between two methods of scorpion venom milking in Morocco. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2013;19:5. <http://dx.doi.org/10.1186/1678-9199-19-5>
  26. **Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150:76-85. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
  27. **Fernández E, Galván A.** Métodos para la cuantificación de proteínas. Fecha de consulta: 12 de diciembre de 2015. Disponible en: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20M%C3%89TODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20PROTE%C3%8DNAS.pdf>.
  28. **Schagger H, von Jagow G.** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 1987;166:368-79. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
  29. **Pimenta A, Martin-Eauclaired MF, Rochat H, Figueiredo S, Kalapothakis E, Afonso LC, et al.** Purification, amino-acid sequence and partial characterization of two toxins with anti-insect activity from the venom of the South American scorpion *Tityus bahiensis* (Buthidae). *Toxicon*. 200;39:1009-19. [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00240-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00240-3)
  30. **Zargan J, Umar S, Sajad M, Naime M, Ali S, Haider A.** Scorpion venom (*Odontobuthus doriae*) induces apoptosis by depolarization of mitochondria and reduces S-phase population in human breast cancer cells (MCF-7). *Toxicol In Vitro*. 2011;25:1748-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.09.002>
  31. **ATCC.** The essentials of life science research. Globally Delivered. Fecha de consulta: 27 de abril 27 de 2016. Disponible en: [https://www.atcc.org/~media/PDFs/QC\\_Straains.ashx](https://www.atcc.org/~media/PDFs/QC_Straains.ashx).
  32. **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
  33. **Borgues A, De Sousa L, Espinoza J, Santos R-G, Kalapothakis E, Valadares D, et al.** Characterization of *Tityus* scorpion venoms using synaptosome binding assays and reactivity towards Venezuelan and Brazilian antivenoms. *Toxicon*. 2008;51:66-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.08.006>
  34. **Schwartz EF, Capes EM, Diego-García E, Zamudio F, Fuentes O, Possani LD, et al.** Characterization of hadrucalcin, a peptide from *Hadrurus gertschi* scorpion venom with pharmacological activity on ryanodine receptors. *Br J Pharmacol*. 2009;157:392-403. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00147.x>
  35. **De Roodt AR.** Veneno de escorpiones (alacranes) y envenenamiento. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2015;49:55-71.
  36. **Kawachi T, Miyashita M, Nakagawa Y, Miyagawa H.** Isolation and characterization of anti-insect  $\beta$ -toxin from venom the scorpion *Isometrus maculatus*. *Biosci Biotechnol*. 2013;77:205-507. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.120697>
  37. **Jäger H, Dreker T, Buck A, Giehl K, Gress T, Grissmer S.** Blockage of intermediate-conductance  $Ca^{2+}$  activated  $K^{+}$  channels inhibit human pancreatic cancer cell growth *in vitro*. *Mol Pharmacol*. 2004;65:630-8. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.65.3.630>

38. **Deshane J, Garner CC, Sontheimer H.** Chlorotoxin inhibits glioma invasion via matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem.* 2003;278:4135-44. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M205662200>
39. **Gupta SD, Gomes A, Debnath A, Saha A, Gomes A.** Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengalin, isolated from Indian black scorpion: Through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins. *Chem Biol Interact.* 2010;183:293-303. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2009.11.006>
40. **Pucca M, Arantes EC, Cerni FA, Peigneur S, Bordon KCF, Tytgat J.** Revealing the function and the structural model of Ts4: Insights into the "non-toxic" toxin from *Tityus serrulatus* venom. *Toxins.* 2015;7:2534-50. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins7072534>
41. **Díaz-García A, Morier-Díaz L, Caballero-Lorenzo Y, Rodríguez-Sánchez H, Caballero-Lorenzo Y, Mendoza-Llanes D, et al.** *In vitro* anticancer effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines. *J Venom Res.* 2013;4:5-12.
42. **DeBin JA, Strichartz GR.** Chloride channel inhibition by the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxincon.* 1991;29:1403-8.
43. **Lyons SA, O'Neal J, Sontherimer H.** Chlorotoxin, a scorpion-derived peptide, specifically binds to glioma and tumors of neuroectodermal origin. *Glia.* 2002;39:162. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.10083>
44. **Sun C, Fang C, Stephen Z, Veiseh O, Hansen S, Lee D, et al.** Tumor-targeted drug delivery and MRI contrast enhancement by chlorotoxin-conjugated iron oxide nanoparticles. *Nanomed.* 2008;3:1-16. <http://dx.doi.org/10.2217/17435889.3.4.495>
45. **Gomes A, Bhattacharjee P, Mishara R, Biswas AK, Dasgupta SC, Giri B.** Anticancer potential of animal venoms as toxins. *Indian J Exp Biol.* 2010;48:93-103.
46. **Caliskan F, Ergene E, Sogut I, Hatipoglu I, Basalp A, Sivas H, et al.** Biological assays on the effects of Acra3 peptide from Turkish scorpion *Androctonus crassicauda* venom on a mouse brain tumor cell line (BC3H1) and production of specific monoclonal antibodies. *Toxicon.* 2013;76:350-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.009>
47. **Incesu Z, Caliskan F, Zeytinoglu H.** Cytotoxic and gelatinolytic activities of *Mesobuthus Gibbosus* (Brullé, 1832) venom. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2005;36. <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/cytotoxic-and-gelatinolytic-activities-mesobuthus-gibbosus-brulle%20C3%A9-1832-venom>
48. **Song X, Zhang G, Sun A, Guo J, Tian Z, Wang H, et al.** Scorpion venom component III inhibits cell proliferation by modulating NF- $\kappa$ B activation in human leukemia cells. *Exp Ther Med.* 2012;4:146-50. <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2012.548>
49. **Estrada-Gómez S, Cupitra NI, Murillo-Arango W, Vargas-Muñoz L-J.** Intraspecific variation of *Centruroides edwardsii* venom from two regions of Colombia. *Toxins.* 2014;6:2082-96. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins6072082>
50. **Santibáñez-López CE, Possani LD.** Overview of the Knottin scorpion toxin-like peptides in scorpion venoms: Insights on their classification and evolution. *Toxicon.* 2015;107:317-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.029>
51. **Jeyaprakash J, Hoy MA.** First divergence time estimate of spiders, scorpions, mites and ticks (subphylum: Chelicerata) inferred from mitochondrial phylogeny. *Exp Appl Acarol.* 2009;47:1-18. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-008-9203-5>

ARTÍCULO ORIGINAL

## Caracterización de pacientes con enfermedades genéticas del esqueleto en un centro colombiano de remisión

Harvy Mauricio Velasco<sup>1,2</sup>, Lina Patricia Buelvas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ortopedia Infantil Roosevelt, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Facultad de Medicina, Departamento de Morfología, Maestría de Genética Humana, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** La prevalencia de talla baja en Colombia es de 10 %, aproximadamente. En el 2009, la *International Skeletal Dysplasia Society* incluyó 456 condiciones clínicas en su clasificación, con base en criterios bioquímicos, radiológicos y moleculares para su diagnóstico.

**Objetivo.** Analizar las variables demográficas, epidemiológicas y clínicas en un grupo de pacientes con enfermedades genéticas del esqueleto, remitidos al Instituto de Ortopedia Infantil Roosevelt.

**Materiales y métodos.** Se analizaron pacientes remitidos entre el 2008 y el 2014, con 167 diagnósticos relacionados con enfermedades genéticas del esqueleto según la Clasificación Internacional de Enfermedades, versión 2010 (CIE-10). Se exploraron las variables demográficas, epidemiológicas y clínicas empleando estadística descriptiva. Se generó una puntuación para las intervenciones que contempló las combinaciones de tratamientos, y se analizaron las variables mediante la prueba t de Student.

**Resultados.** El motivo de consulta más frecuente fue por sospecha de enfermedad genética del esqueleto. Entre los tipos de tratamiento, se consideraron los de soporte, los quirúrgicos, el farmacológico y la 'ortesis', y se pudo establecer que los pacientes con enfermedades genéticas del esqueleto obtenían puntajes mayores en la variable de intervención y menores en las de talla alta y baja.

**Conclusiones.** El diagnóstico de la mayoría de los pacientes remitidos respondía a enfermedades genéticas del esqueleto, talla baja y otras enfermedades genéticas monogénicas. Se encontraron diferencias significativas entre la edad de inicio de los síntomas y la de diagnóstico, así como diversos enfoques terapéuticos. Hubo menos intervenciones en los pacientes con talla alta y baja, lo cual podría alertar sobre la necesidad de reevaluar las necesidades terapéuticas de este grupo.

**Palabras clave:** enfermedades del desarrollo óseo; esqueleto; genética; estatura; Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.2980>

### Characterization of patients with skeletal genetic diseases in a Colombian referral center

**Introduction:** Short height in Colombia has an estimated prevalence of 10%. The 2009 Nosology and Classification of Skeletal Genetic Diseases described 456 clinical conditions using biochemical, molecular and radiological criteria for diagnosis.

**Objective:** To analyze demographic, epidemiological and clinical variables in a group of patients with skeletal genetic diseases referred to the *Instituto de Ortopedia Infantil Roosevelt*.

**Materials and methods:** Patients referred between 2008 and 2014 were analyzed filtering 167 diagnoses of the International Classification of Diseases, 10<sup>th</sup> revision (ICD 10), related to skeletal genetic diseases. Demographic, epidemiological and clinical variables were explored using descriptive statistics. An intervention score was generated contemplating different combinations of treatments. An inferential statistical analysis using Student's t test was performed on such variables.

**Results:** The most frequent reason for consultation was suspicion of a genetic skeletal disorder. The types of treatments considered included support, surgical, pharmacological and orthotics, and it was established that genetic skeletal disorders were associated with higher intervention scores while tall and short height showed a lower score.

**Conclusions:** Most referred patients were classified with genetic bone diseases, short stature and other monogenic genetic diseases. Significant differences were found between the age at symptoms onset and the age of diagnosis. Diversity was found in the therapeutic approach among different groups of pathologies. Patients with tall and short height showed lower intervention scores, which may warn on the need to reassess the therapeutic requirements of these groups.

**Key words:** Bone diseases, developmental; skeleton; genetics; body height; Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.2980>

### Contribución de los autores:

Ambos autores contribuyeron a la recopilación, el análisis y la interpretación de los datos, y en la escritura del manuscrito.

La talla baja tiene una prevalencia en la población general de 2 a 5 % (1,2). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la prevalencia de niños con déficit de altura ha venido reduciéndose. En Suramérica, esta tendencia también se ha reflejado en la reducción de su frecuencia de 25,1 a 9,3 %, entre 1980 y 2000 (3). En el 2005, la prevalencia de talla baja reportada en Colombia fue de 13,9 %, aproximadamente, sin discriminar según su etiología (4), en tanto que se redujo a 10 % en el 2010 (5).

Esta condición es una de las preocupaciones más frecuentes en los servicios de salud pediátricos de endocrinología, gastroenterología y ortopedia, entre otras especialidades (6,7), y es la segunda causa de consulta en genética en Colombia (8 % de los pacientes atendidos) (8). La talla baja se define clínicamente como una estatura por debajo de -2 desviaciones estándar, o menor al percentil 3, para la edad y el sexo, con respecto a la población general (1,9).

Existen múltiples clasificaciones de la talla baja, por ejemplo, la división entre no patológica (talla baja familiar y constitucional) y la patológica (10). La *European Society for Paediatric Endocrinology* (ESPE) subdivide esta última en tres categorías: falla primaria del crecimiento, falla secundaria del crecimiento y talla baja idiopática (11). En la primera categoría, se describen los síndromes clínicamente definidos, el grupo de pequeños para la edad de gestación con fallas en el patrón de recuperación del crecimiento y las displasias esqueléticas.

A partir de la creación de la *International Skeletal Dysplasia Society* (ISDS) en 1999, se constituyó un comité *ad hoc* encargado de la estandarización clínica, radiológica y molecular de estas displasias esqueléticas (12,13). En la reunión de expertos de agosto de 2009 se elaboró la nosología y la clasificación de las enfermedades genéticas del esqueleto, describiendo 456 condiciones clínicas organizadas en 40 grupos, con base en criterios bioquímicos, radiológicos y moleculares, con el fin de establecer una lista de referencia que sirviera de respaldo en el proceso de diagnóstico (14).

Dadas las limitaciones de información regional y local sobre algunas variables clínicas de los pacientes con talla baja y enfermedades genéticas

del esqueleto, el objetivo de este estudio fue analizar dichos elementos en un grupo poblacional, mayoritariamente de niños, remitidos a un centro especializado en enfermedades osteomusculares, y compararlos con algunos de los reportados en la literatura científica mundial.

## Materiales y métodos

Se hizo un estudio retrospectivo en el cual se analizaron los pacientes remitidos entre el 2008 y el 2014 a consulta externa y hospitalización en esta institución. Como filtro inicial, se tomaron 167 diagnósticos de la CIE-10 relacionados con enfermedades genéticas del esqueleto, con lo cual se seleccionaron 3.204 historias clínicas; de estas, se escogieron las de aquellos pacientes que acudieron a valoración genética, lo cual resultó en un número de 477 pacientes, cuyos registros se revisaron y se encontraron 35 con datos incompletos, por lo cual no se consideraron para el estudio. Por consiguiente, en total, se incluyeron 442 pacientes.

Se encontraron 289 motivos diferentes de consulta, difíciles de enmarcar en alguna de las clasificaciones clínicas mencionadas y, por ello, se establecieron siete categorías discrecionales para agruparlos y así facilitar el análisis:

- 1) hallazgos clínicos no relacionados con la talla,
- 2) otros problemas esqueléticos,
- 3) sospecha de cromosomopatía,
- 4) sospecha de enfermedad genética del esqueleto,
- 5) sospecha de otras enfermedades genéticas monogénicas,
- 6) talla alta, y
- 7) talla baja.

Además, se estableció una puntuación para los tipos de intervención, que contempló las combinaciones de tratamientos en una ponderación discrecional (ninguno=0; soporte=1; 'ortesis'=1; farmacológico=2; quirúrgico=5). También, se valoró el uso de estudios diagnósticos específicos para la enfermedad sospechada, su posible mecanismo de herencia y la presencia de antecedentes familiares asociados.

Posteriormente, para una mejor comprensión de sus condiciones y para establecer relaciones entre las variables analizadas, se caracterizó a la población mediante las siguientes técnicas de análisis exploratorio de datos:

### Correspondencia:

Harvy Mauricio Velasco, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia  
Teléfono: (571) 316 5000, extensiones 11631 y 11620  
hmvelascop@unal.edu.co y hvelasco@ioir.org.co

Recibido: 16/07/15; aceptado: 07/09/16

a) análisis estadístico unidimensional con cuadros de salida para las variables de sexo, edad de inicio de síntomas y de diagnóstico, motivo de consulta, diagnóstico y tratamiento;

b) análisis estadístico bidimensional, con el cual se relacionaron las diferentes variables del estudio (sexo y edad, edad y motivos de consulta, diagnóstico y cirugías); además, se hicieron pruebas de diferencia de medias entre la agrupación de los pacientes por motivo de consulta y por diagnóstico, y

c) análisis de correspondencias simples para determinar la homogeneidad entre las variables y las agrupaciones de los pacientes según los diagnósticos y los tratamientos (motivo de consulta y diagnóstico final, diagnóstico final y la puntuación de la intervención), mediante la prueba de ji al cuadrado de Pearson, con el fin de analizar la correlación entre estas variables. Los análisis estadísticos se hicieron con el programa SPSS®, versión 22.

### Consideraciones éticas

El manejo de la información obtenida de la base de datos del Instituto de Ortopedia Infantil Roosevelt obedeció a estándares de confidencialidad y privacidad. Este trabajo fue debidamente aprobado por el Comité de Ética e Investigación de esta institución.

### Resultados

Se analizaron 442 individuos, 198 mujeres (44,7 %) y 244 hombres (55,2 %), provenientes en su gran mayoría de Cundinamarca (80,5 %) y, específicamente, de Bogotá (74,4 %); otros sitios de remisión fueron los departamentos de Tolima (5,2 %) y Boyacá (2,7 %).

La condición mayoritariamente diagnosticada en esta población por los médicos consultados fue el enanismo (16,9 %) (código E34.3 de la CIE-10: "no clasificado en otra parte"), seguido por síndromes de malformaciones congénitas asociadas principalmente con estatura baja (16,4 %) (Q871 de la CIE-10), otros trastornos del desarrollo y crecimiento óseo (10,61 %) (M892 de la CIE-10) y neurofibromatosis (9,93 %) (Q850 en la CIE-10).

La media de la edad de inicio de los síntomas fue de 2,58 años (intervalo de confianza, IC:  $\pm 4,88$ ). La mayoría de los pacientes presentó los síntomas desde el momento del nacimiento (42,7 %), grupo seguido por la aparición de síntomas entre 0 y 1 año de edad (18 %), y entre 1 y 3 años (14 %) (cuadro 1). En la historia clínica de 15,3 % de los pacientes, se reportaba la aparición de síntomas

prenatales y no se encontraron diferencias entre los sexos con relación a este ítem (no se presentan los datos).

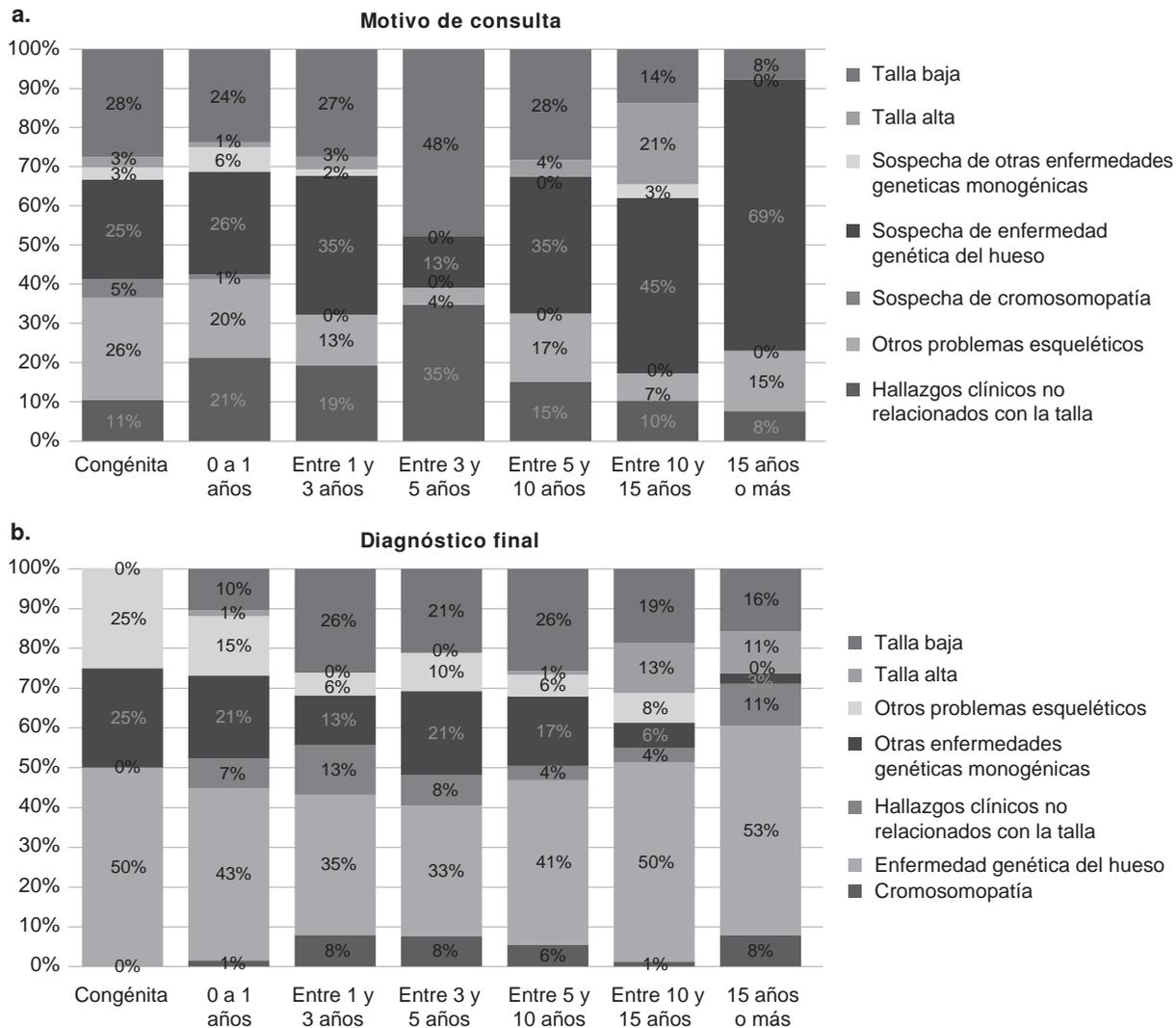
La media de edad de la impresión diagnóstica fue de 6,3 años (IC:  $\pm 6,1$ ). En el 7 % de los pacientes el diagnóstico se produjo en los 12 primeros meses de vida, en el 32 %, entre el primero y el quinto año de vida, y en el 44,6 %, a partir de los 5 años (cuadro 1). En la figura 1 se presenta el amplio espectro de frecuencia de los síntomas e impresiones diagnósticas en todas las franjas etarias analizadas. Al comparar la edad de inicio de los síntomas con la de la impresión diagnóstica, se observó una gran variabilidad entre ellas (figura 2), con diferencias significativas entre las edades promedio de una y otra (cuadro 1).

Los motivos de consulta más frecuentes en esta población fueron la sospecha de una enfermedad genética del esqueleto (30 %), la talla baja (26 %) y otros problemas esqueléticos (19 %) (cuadro 2).

Al revisar las categorías de diagnóstico confirmado y sospecha, se encontró que en 42 % de la población se había registrado la enfermedad genética del esqueleto, seguida por la talla baja en el 20 % y otras enfermedades genéticas monogénicas en el 14 % (cuadro 2 y figura 3).

**Cuadro 1.** Sexo, edad de inicio de síntomas y edad de la impresión diagnóstica

Característica	Mujer n (%)	Hombre n (%)	Total (%)	p
Sexo	198 (44,7)	244 (55,2)	100	0,21863338
Edad de inicio de los síntomas (años)				
Congénita	89 (45)	100 (41)	43	
0 a 1	36 (18)	44 (12)	18	
1 a 3	28 (14)	34 (14)	14	
3 a 5	8 (4)	15 (6)	5	
5 a 10	21 (11)	25 (10)	10	
10 a 15	11 (6)	18 (7)	7	
Más de 15	5 (3)	8 (3)	3	
Media			2,583	0,0256
Desviación estándar			4,88	
Edad al diagnóstico (años)				
Congénita	4 (0,9)	4 (0,9)	1,80	
0 a 1	44 (9,9)	52 (11,7)	21,70	
1 a 3	39 (8,8)	55 (12,4)	21,20	
3 a 5	19 (4,3)	28 (6,3)	10,60	
5 a 10	51 (11,5)	44 (9,9)	21,40	
10 a 15	31 (7)	47 (10,6)	17,60	
Más de 15	11 (2,5)	14 (3,2)	5,60	
Media			6,308	0,0193
Desviación estándar			6,104	
Edad de inicio de síntomas Vs. edad al diagnóstico				3,55 <sup>-56</sup>



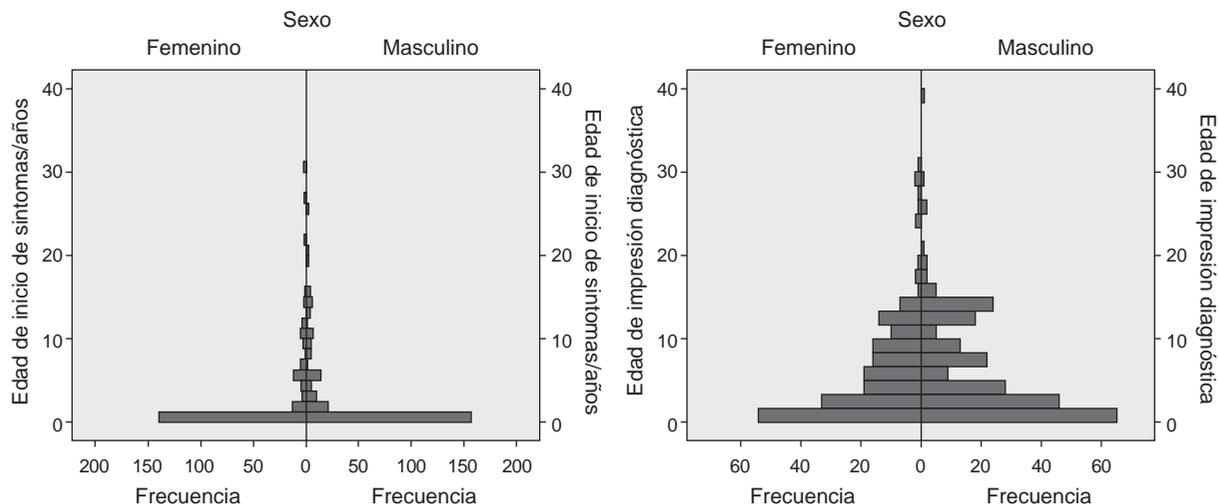
**Figura 1. a.** Distribución de la población según el motivo de consulta. Nótese la elevada frecuencia de los motivos de consulta por talla baja entre los 3 y los 5 años, el incremento de la talla alta después de los 10 años y el aumento de la sospecha de enfermedad genética del esqueleto después de los 5 años. **b.** Los diagnósticos de enfermedad genética del esqueleto se incrementaron a partir de los 3 años; el diagnóstico de talla alta aparece después de los cinco años, y el porcentaje de enfermedades genéticas monogénicas se fue reduciendo a partir del año de edad.

Los cinco diagnósticos finales más frecuentes sin categorización fueron: talla baja posnatal simétrica (53 pacientes), neurofibromatosis (43 pacientes), talla baja prenatal simétrica (29 pacientes), síndrome de Marfán (19 pacientes) y síndrome de Noonan (13 pacientes); muchos otros diagnósticos correspondieron a un solo caso (por ejemplo, el síndrome de Holt Oram o el síndrome de Smith Lemli Opitz), o se presentaron con una frecuencia menor de 3 %.

Al comparar los ítems de motivo de consulta y diagnóstico final, no se encontraron diferencias significativas entre ellos ( $p=1,94318$ ). En el análisis de correspondencias de estas variables, no se

establecieron conglomerados, lo cual ratificó la ausencia de diferencia en los datos mencionados, aunque sí se observó una preferencia por las variables de talla alta (6) y talla baja (7); además, estas mostraron una relación cercana entre el motivo de consulta y el diagnóstico final, y se diferenciaban por su comportamiento entre ellas dos y con las otras categorías (figura 4).

En 27,1 % de los 442 pacientes con sospecha de estas enfermedades se solicitaron estudios diagnósticos específicos, con resultados confirmatorios en 16,7 % de ellos. El 95 % de los pacientes evaluados no tenía antecedentes familiares de enfermedades relevantes; en cuanto al mecanismo de herencia de



**Figura 2.** Distribución etaria según el inicio de los síntomas y la impresión diagnóstica. Los gráficos muestran cómo la edad de inicio de los síntomas más frecuente fue entre los 0 y 2 años, pero la edad de diagnóstico tuvo una variación mucho mayor, pues se extendió hasta los 14 años tanto en hombres como en mujeres.

**Cuadro 2.** Categorías de los motivos de consulta y los diagnósticos finales

	Femenino (n)	%	Masculino (n)	%	Total (n)	%
<b>Motivo de consulta</b>						
Hallazgos clínicos no relacionados con la talla	25	13	43	18	68	15
Otros problemas esqueléticos	38	19	48	20	86	19
Sospecha de cromosomopatía	8	4	2	1	10	2
Sospecha de enfermedad genética del esqueleto	62	31	70	29	132	30
Sospecha de otras enfermedades genéticas monogénicas	4	2	9	4	13	3
Talla alta	5	3	11	5	16	4
Talla baja	56	28	61	25	117	26
Total	198	100	244	100	442	100
<b>Diagnóstico final</b>						
Cromosomopatía	13	7	9	4	22	5
Enfermedad genética del esqueleto	84	42	102	42	186	42
Hallazgos clínicos no relacionados con la talla	12	6	19	8	31	7
Otras enfermedades genéticas monogénicas	27	14	36	15	63	14
Otros problemas esqueléticos	15	8	19	8	34	8
Talla alta	6	3	10	4	16	4
Talla baja	41	21	49	20	90	20
Total	198	100	244	100	442	100

las enfermedades confirmadas y sospechadas, el 53,7 % de los casos se catalogaron como idiopáticos; el 32 %, como probablemente autosómicos dominantes; el 7,9 % como autosómicos recesivos; en el 5,4 % no aplicaba, y el 0,9 %, como ligados al cromosoma X.

En cuanto a los tipos de tratamiento, se consideraron las opciones de ausencia de tratamiento, tratamiento con un único medicamento o con varios, así como las intervenciones quirúrgicas, de soporte y la 'ortesis'. El porcentaje acumulado de pacientes con algún tipo de soporte (terapias física, ocupacional o del lenguaje) fue de 36,6 %, con intervenciones

quirúrgicas (22,8 %), con manejo farmacológico (19,9 %) y con 'ortesis' (9,9 %), en tanto que el 40,9 % no recibía ningún tratamiento.

El 14,7 % de los pacientes había sido sometido a algún tipo de cirugía ortopédica y al menos el 5 % requirió mas de una intervención quirúrgica. Según la categoría de diagnóstico (confirmado o sospecha), las enfermedades genéticas del esqueleto fueron las que más frecuentemente se sometieron a intervenciones ortopédicas, seguidas por otras enfermedades monogénicas y otros problemas esqueléticos. En el grupo con talla alta, no se habían practicado intervenciones quirúrgicas.

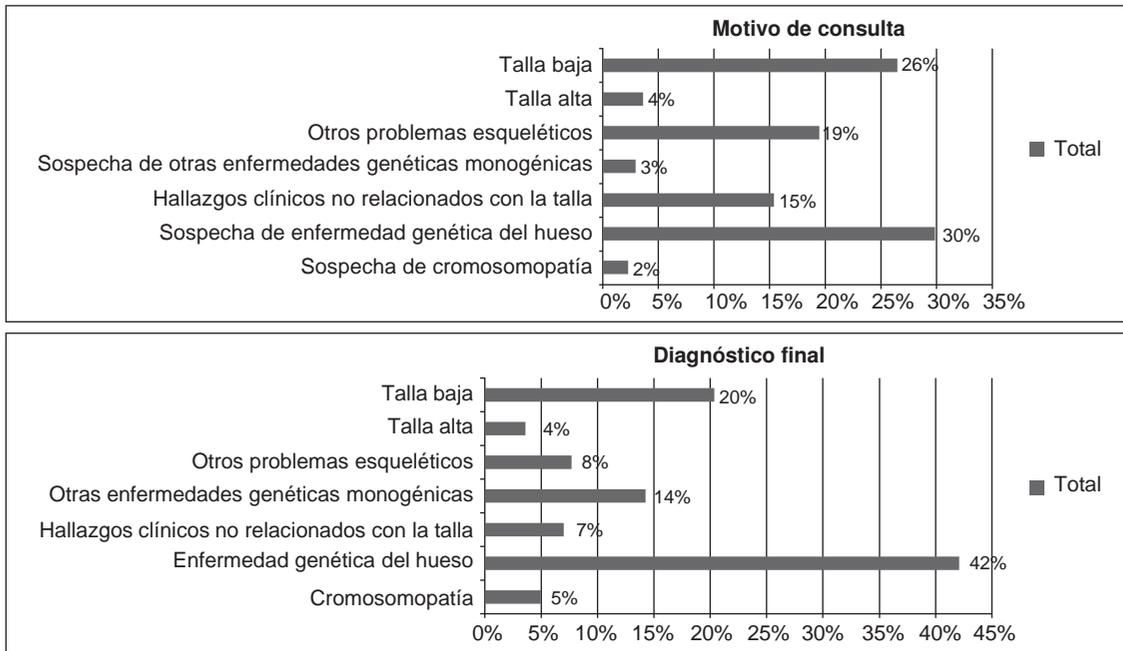


Figura 3. Categorías según motivo de consulta y diagnóstico final

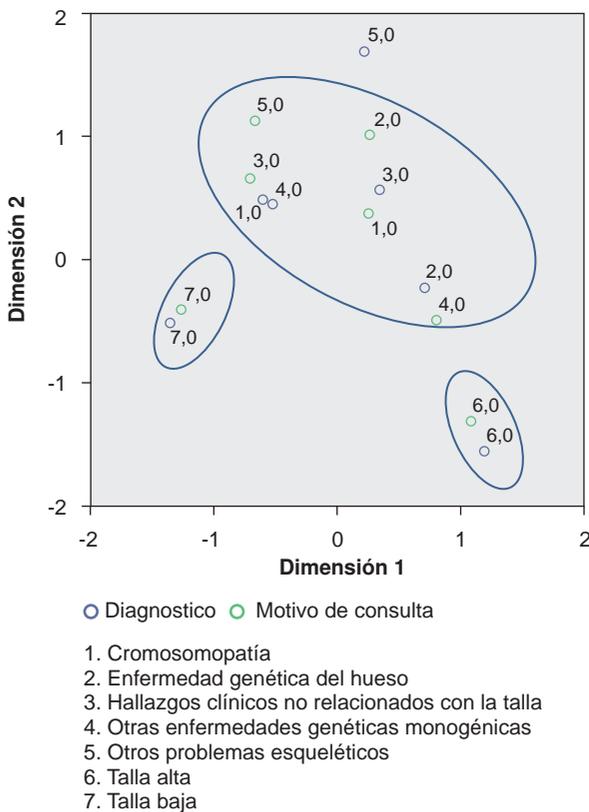
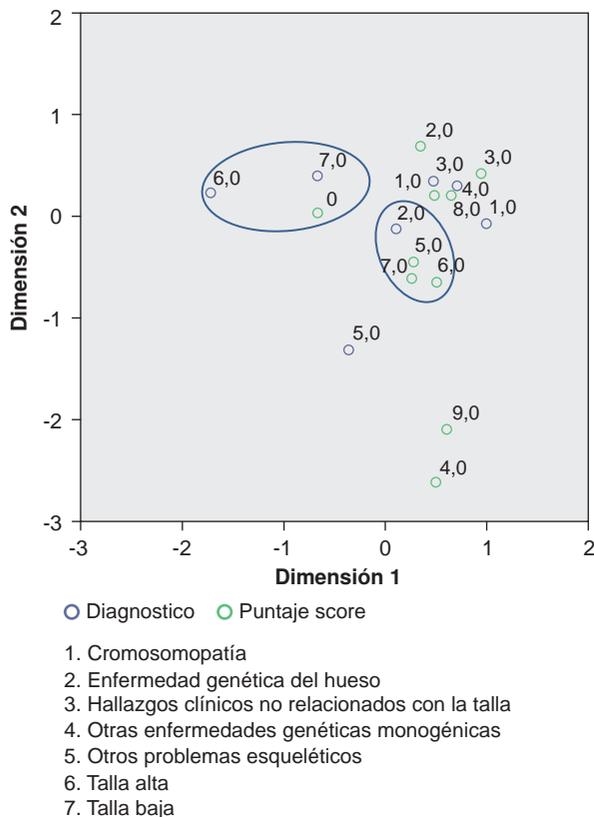


Figura 4. Análisis de correspondencias entre el motivo de consulta y el diagnóstico final. Se logró establecer la presencia de tres agrupaciones: una de talla baja, otra de talla alta y otra general, la cual abarcó las cromosomopatías, las enfermedades monogénicas y otras condiciones no relacionadas con la talla.

La ponderación de la puntuación de las intervenciones según el tipo de tratamiento se hizo a partir de un valor de 0 (ningún tratamiento) hasta 9 (tratamiento farmacológico, quirúrgico, uso de prótesis y soporte); dicha información se cruzó con el dato sobre el diagnóstico final (confirmado o sospecha) en otro análisis de correspondencias, en el cual se encontraron dos tendencias: una de puntajes de 5 a 7 en pacientes con diagnóstico de enfermedad genética del esqueleto, y otra de puntajes cercanos a 0 en aquellos con diagnósticos de talla alta o talla baja (figura 5).

**Discusión**

Durante el periodo de seis años, se atendieron 3.200 pacientes, aproximadamente, con impresión diagnóstica o sospecha de talla baja o enfermedades genéticas del esqueleto; en 11,7 % de ellos se solicitó valoración genética, cifra semejante a la encontrada en las remisiones de pacientes con talla baja hacia especialidades como la endocrinología o la gastroenterología pediátricas (15). Este motivo de consulta es uno de los más frecuentes en los servicios de genética (8,16), dada la importancia de establecer el diagnóstico etiológico en los niños, el cual frecuentemente es genético (enfermedades del esqueleto, tallas bajas idiopáticas originadas en el gen *SHOX* o síndromes monogénicos relacionados con la talla baja), así como el pronóstico clínico y el riesgo de recurrencia (17,18).



**Figura 5.** Análisis de correspondencia entre los diagnósticos finales y la puntuación de intervención. Se observa que los diagnósticos de talla alta y talla baja presentaron correspondencias con puntuaciones de intervención de 0, en tanto que los diagnósticos de enfermedades genéticas del esqueleto se acercaron a puntuaciones entre 5 y 7.

La distribución por sexo en la población de estudio fue semejante a la reportada en otras investigaciones como el estudio prospectivo de Flechter, *et al.* en 1.402 hombres (56,2 %) remitidos a un centro pediátrico de referencia entre 2004 y 2009 (19), y el de Majcher, *et al.*, en 274 niños y 178 niñas con diagnóstico de talla baja, entre 1998 y 2009 (20). Esta tendencia ya ha sido objeto de análisis y se ha encontrado un menor número de remisiones a especialistas en la población femenina, lo que resulta en la ausencia de diagnóstico y en la falta de detección o el diagnóstico incorrecto o tardío de la condición, sobre todo cuando se trata de talla baja y se debe descartar el síndrome de Turner y el déficit de la hormona de crecimiento (15).

En cerca de la mitad de la población analizada (42,7 %), se reportaron signos congénitos con probable inicio de la enfermedad en el periodo prenatal tardío, probablemente relacionados con antecedentes como la condición de pequeño para la edad de gestación o con la restricción del

crecimiento intrauterino. Sin embargo, al revisar el registro de síntomas prenatales, solo el 15,3 % de los pacientes lo presentaba, porcentaje que, probablemente, refleja solamente una parte del grupo afectado por enfermedades genéticas del esqueleto o cromosopatías, pero no así el de talla baja de origen endocrino; a ello se añade que, en Colombia, la detección de displasias esqueléticas por ecografía obstétrica es muy baja (21). Estos valores contrastan con los reportados en otros estudios de prevalencia de enfermedades genéticas del esqueleto, como el de la población de Utah en 2012, con 55,6 % de casos de sospecha prenatal, de los cuales el 88 % resultó en aborto, lo que demuestra la necesidad de mejorar la sospecha clínica en la población local mediante los estudios prenatales de imágenes, para su posterior confirmación molecular y manejo integral y oportuno (22).

Se encontraron diferencias significativas entre la edad de inicio de los síntomas (2,58 años, en promedio) y la edad de diagnóstico (6,3 años, en promedio); llamó mucho la atención que la demora diagnóstica fue de casi cuatro años. Probablemente, varios factores influyeron en estas diferencias: la heterogeneidad de los diagnósticos de la población de estudio (176 códigos diagnósticos de CIE-10 y 195 diagnósticos finales, de los cuales los cinco primeros solo representaban el 31,3 %); el amplio espectro de edades de diagnóstico (figura 2) y la particularidad de que la detección de enfermedades genéticas del esqueleto en los pacientes se hizo en diversas edades (figura 1). Además, deben señalarse otros factores que podrían propiciar las diferencias entre la edad de inicio de síntomas y la del diagnóstico, tales como los relacionados con la calidad de la atención, la experiencia de los grupos encargados de la atención en el sistema de salud, la oportunidad en la atención, las barreras de acceso al sistema, el adecuado empleo de tecnologías de la salud y la falta de empoderamiento familiar frente a la condición de salud del menor, entre otros, los cuales podrían afectar, asimismo, las condiciones clínicas, sociales, económicas y emocionales de estos pacientes (23).

En este estudio, 75 % de los pacientes consultó por sospecha de enfermedad genética del esqueleto, talla baja y otros problemas esqueléticos, la cual se confirmó en el diagnóstico final como enfermedad genética del esqueleto en 42 % de los evaluados: como talla baja (20 %) relacionada con problemas endocrinológicos en 53 de aquellos con talla baja posnatal simétrica y en 29 de aquellos

con talla baja prenatal simétrica, y como otras enfermedades genéticas monogénicas (14 %) en 13 casos de síndrome de Noonan y cuatro de síndrome de Russell-Silver, así como en otros con problemas esqueléticos (8 %).

Al revisar otros estudios publicados, los datos de este contrastaron con los reportados por Flechtner, *et al.*, en 2.546 pacientes con talla baja evaluados a lo largo de cinco años, 12 % de los cuales presentaba trastornos endocrinos, 8,9 %, trastornos de etiología genética, 5,1 %, condiciones crónicas, y 5,9 %, displasias óseas (19).

En el centro de referencia del presente estudio, aparentemente se remite con mayor frecuencia a valoración genética a pacientes con diagnóstico de enfermedad genética de esqueleto, talla baja, otras enfermedades genéticas monogénicas u otros problemas esqueléticos, pues la frecuencia de defectos congénitos fue mayor en estos individuos. Es probable que en las clínicas de endocrinología pediátrica, se atiende un número más significativo de pacientes con diagnóstico de talla baja relacionada con el retardo constitucional del desarrollo, malnutrición, enfermedad celiaca, déficit de la hormona de crecimiento o talla baja familiar, que con enfermedades genéticas del esqueleto (24,25).

Los diagnósticos finales con etiología clara de enfermedades genéticas del esqueleto correspondieron a 37,1 % (164 pacientes), distribuidos en 22 de los 40 grupos de la nosología y la clasificación, siendo el más frecuente el 29 (46 pacientes con enfermedades del grupo de componentes esqueléticos con desarrollo desorganizado), seguido por el 30 (36 pacientes con síndromes de crecimiento excesivo y compromiso esquelético), el 27 (17 pacientes con enfermedades de depósito lisosómico y compromiso esquelético), el 25 (11 pacientes con osteogénesis imperfecta u otras enfermedades con disminución de la densidad ósea), y el 4 (10 pacientes con alteraciones de la sulfatación), entre otros, lo cual contrasta ampliamente con el estudio de Flechtner, *et al.*, en el cual se evaluaron pacientes con talla baja idiopática y pequeños para la edad de gestación, entre quienes los grupos preponderantes fueron el 1 (condrodismatosis, FGFR3) y el 17 (displasia mesomélica y rizomesomélica) (19). Es probable que estas diferencias se deban a que, en este estudio, el rango de edad de los pacientes era mayor (0 a 21 años; media de edad: 9,5 años) y las posibilidades de acceso al diagnóstico confirmatorio mediante métodos moleculares también lo eran.

El presente estudio se enfocó en la elección de los códigos diagnósticos de la CIE-10 relacionados con la talla baja y las enfermedades genéticas del esqueleto; posteriormente, se clasificó a los pacientes en siete grupos según los motivos de consulta y en otros siete según el diagnóstico final, dado que las clasificaciones endocrinológicas y genéticas generales eran muy heterogéneas y difíciles de extrapolar. A pesar de ello, en la población de estudio se pudieron diferenciar tres condiciones: "talla baja", "talla alta" y "otros" (enfermedades que comprometen el esqueleto).

Al evaluar el manejo de los pacientes, se encontró una gran diversidad de enfoques que incluía terapias, 'ortesis', tratamientos farmacológicos, intervenciones quirúrgicas y combinaciones de estos. Con base en la puntuación de las intervenciones diseñadas en el marco del estudio, se pudo establecer que los pacientes con enfermedades genéticas del esqueleto habían sido sometidos a una mayor cantidad de intervenciones terapéuticas, quizá debido a su conocida comorbilidad, seguidos de aquellos con cromosomopatías, en tanto que, en casos de talla alta o talla baja, poco se recurrió a la combinación de tratamientos. Ello respondería, primero, a que no se había comenzado el tratamiento por haberse hecho el primer diagnóstico en la institución del estudio; segundo, al desconocimiento de nuevos enfoques y terapias para enfermedades acompañadas de talla alta o baja, y tercero, a las dificultades de acceso al tratamiento especializado en el sistema de salud del país (consultas de genética o endocrinología pediátrica), entre otros. Dichos factores deben alertar a los profesionales de la salud sobre la necesidad de una mayor y más oportuna intervención en estos dos grupos de pacientes.

Por último, es necesario hacer claridad sobre algunos aspectos metodológicos: 1) pudo haber algún sesgo de selección en la muestra, ya que se partió de un ejercicio académico de selección de los códigos de la CIE-10 para agrupar la gran mayoría de los diagnósticos relacionados con enfermedades genéticas del esqueleto; 2) pudo haber un factor de confusión en la categorización de los motivos de consulta y el diagnóstico definitivo, pues algunos pudieron estar superpuestos; 3) solamente el 16,7 % de los pacientes tenía diagnóstico confirmado, de modo que pudo haber errores de clasificación, ya que en la mayoría de ellos se apeló a elementos clínicos, bioquímicos y radiológicos, muchas veces no concluyentes, para diagnosticar estas enfermedades, y 4), dado que no se trataba de un estudio

con seguimiento, la impresión diagnóstica pudo haber cambiado con el tiempo y, por ende, la categorización de los pacientes.

A pesar de ello, este trabajo es uno de los primeros a nivel regional que ha descrito algunos elementos epidemiológicos, clínicos y de manejo de las enfermedades genéticas del esqueleto, lo cual contribuye a la adopción de decisiones sobre nuevos tipos de intervenciones y sobre el seguimiento de este tipo de pacientes.

### Agradecimientos

A los genetistas, ortopedistas, endocrinólogos y pediatras, entre otros especialistas, encargados de la valoración de los pacientes en el Instituto de Ortopedia Infantil Roosevelt.

### Conflicto de intereses

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

### Financiación

No hubo ninguna.

### Referencias

1. **Wit JM, Clayton PE, Rogol D, Savage MO, Saenger PH, Cohen P.** Idiopathic short stature: Definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Horm IGF Res.* 2008;18:89-110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ghir.2007.11.004>.
2. **Zahnleiter D, Uebe S, Ekici AB, Hoyer J, Wiesener A, Wieczorek D, et al.** Rare copy number variants are a common cause of short stature. *PLoS Genet.* 2013;9:1-11. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003365>.
3. **Strufaldi MWL, Silva EM, Puccini RF.** Follow-up of children and adolescents with short stature: The importance of the growth rate. *São Paulo Med J.* 2005;123:128-33. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-31802005000300008>
4. **Neufeld L, Rubio M, Pinzón L, Tolentino L.** Nutrición en Colombia: estrategia de país 2011-2014. Banco Interamericano de Desarrollo. 2010. Fecha de consulta: 1° de mayo de 2015. Disponible en: <http://idbdocs.iadb.org/wsdocs/getdocument.aspx?docnum=35791560>.
5. **Fonseca Z, Heredia A, Ocampo P, Forero Y, Sarmiento O, Álvarez M, et al.** Encuesta Nacional de Situación Nutricional en Colombia 2010. Fecha de consulta: 1° de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.icbf.gov.co/portal/page/portal/PortalICBF/Bienestar/ENSIN1/ENSIN2010/LibroENSIN2010.pdf>.
6. **Cohen P, Rogol D, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, et al.** Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: A summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:4210-7. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2008-0509>
7. **Wit JM, Kiess W, Mullis P.** Genetic evaluation of short stature. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25:1-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2010.06.007>
8. **Acosta J, Zarante I.** Consulta de genética médica en un hospital de segundo nivel en Colombia: impacto médico y social. *Revista Salud Bosque.* 2011;1:25-32.
9. **Pombo M, Castro L, Rodríguez PC.** El niño de talla baja. *Protoc Diagn Ter Pediatr.* 2011;1:236-54.
10. **Del Toro KY, Durán P, Llano M.** Enfoque del paciente con talla baja en pediatría. *CAAP.* 2008;7:28-37. Fecha de consulta: 1° de mayo de 2015. Disponible en: [https://scp.com.co/precop-old/precop\\_files/modulo\\_7\\_vin\\_2/28-37%20Enfoque.pdf](https://scp.com.co/precop-old/precop_files/modulo_7_vin_2/28-37%20Enfoque.pdf)
11. **Wit JM, Ranke MB, Kelnar CJ.** Editores. *The ESPE classification of paediatric endocrine diagnoses.* Basel: Editorial Karger; 2007. p. 129.
12. **Hall CM.** International nosology and classification of constitutional disorders of bone (2001). *Am J Med Genet.* 2002; 113:65-77. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.10828>
13. **Superti-Furga A, Unger S.** Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2006 revision. *Am J Med Genet A.* 2007;143:1-18. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.31483>
14. **Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Lachman R, LeMerrer M, et al.** Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am J Med Genet A.* 2011;155:943-68. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.33909>
15. **Grimberg A, Feemster KA, Pati S, Ramos M, Grundmeier R, Cucchiara AJ, et al.** Medically underserved girls receive less evaluation for short stature. *Pediatrics.* 2011;127:696-702. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2010-1563>.
16. **Esmer C, Urraca N.** Patient follow-up is a major problem at genetics clinics. *Am J Med Genet A.* 2004;125:162-6. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.20303>
17. **Seaver LH, Irons M, American College of Medical Genetics (ACMG) Professional Practice and Guidelines Committee.** ACMG practice guideline: Genetic evaluation of short stature. *Genet Med.* 2009;11:465-70. <http://dx.doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181a7e8f8>
18. **Sewell MD, Chahal A, Al-Hadithy N, Blunn GW, Molloy S, Hashemi-Nejad A.** Genetic skeletal dysplasias: A guide to diagnosis and management. *J Back Musculoskelet Rehabil.* 2015;28:575-90. <http://dx.doi.org/10.3233/BMR-140558>
19. **Flechtner I, Lambot-Juhan K, Teissier R, Colmenares A, Baujat G, Beltrand J, et al.** Unexpected high frequency of skeletal dysplasia in idiopathic short stature and small for gestational age patients. *Eur J Endocrinol.* 2014;170:677-84. <http://dx.doi.org/10.1530/EJE-13-0864>
20. **Majcher A, Witkowska-Sędek E, Bielecka-Jasiocha J, Pyrzak B.** Causes of short stature in children in relation to their midparental height. *Medycyna Wieku Rozwojowego.* 2012;16:89-95.
21. **Gómez J, Fernández N, Páez P, Zarante I.** Detección de anomalías congénitas en 12.760 nacimientos de tres hospitales en la Ciudad de Bogotá, Colombia, 2004-2005 mediante ecografía prenatal. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2007;58:194-201.

22. **Konstantinidou AE, Agrogiannis G, Sifakis S, Karantanas A, Harakoglou V, Kaminopetros P, et al.** Genetic skeletal disorders of the fetus and infant: Pathologic and molecular findings in a series of 41 cases. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009;85:811-21. <http://dx.doi.org/10.1002/bdra.20617>.
23. **Arkader A.** Multiple hereditary exostoses: Its burden on childhood and beyond: Commentary on an article by A.L. Goud, MD, et al.: "Pain, physical and social functioning, and quality of life in individuals with multiple hereditary exostoses in The Netherlands. A national cohort study". *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94:e81. <http://dx.doi.org/10.2106/JBJS.L.00277>
24. **Zargar AH, Laway BA, Masoodi SR, Wani AI, Salahuddin M.** An etiological profile of short stature in the Indian subcontinent. *J Paediatr Child Health.* 1998;34:571-6. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1754.1998.00308.x>
25. **Sultan M, Afzal M, Qureshi SM, Aziz S, Lutfullah M, Khan SA, et al.** Etiology of short stature in children. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2008;18:493-7. <http://dx.doi.org/08.2008/JCPSP.493497>

COMUNICACIÓN BREVE

## Asociación de variantes polimorfas de los genes *PTPN22*, *TNF* y *VDR* en niños con nefritis lúpica: un estudio de tríos en familias colombianas

Gloria Garavito<sup>1</sup>, Eduardo Egea<sup>1</sup>, Luis Fang<sup>2</sup>, Clara Malagón<sup>3</sup>, Carlos Olmos<sup>4</sup>, Luz González<sup>3</sup>, Pilar Guarnizo<sup>4</sup>, Gustavo Aroca<sup>5</sup>, Guillermo López<sup>6</sup>, Antonio Iglesias<sup>7</sup>

<sup>1</sup> División Ciencias de la Salud, Grupo de Investigación en Inmunología y Biología Molecular, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia

<sup>2</sup> Corporación Universitaria Rafael Núñez, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia

<sup>3</sup> Ciencias de la Salud, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>4</sup> Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>5</sup> Ciencias de la Salud, Grupo de Investigación Nefrología, Universidad Simón Bolívar, Barranquilla, Colombia

<sup>6</sup> Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Grupo de Investigación en Biología Celular y Biotecnología, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España

<sup>7</sup> Ciencias de la Salud, Grupo Unidad de Reumatología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmunitaria cuya gravedad varía según la raza, el sexo y la edad de aparición. Esta disparidad también se observa en los marcadores genéticos asociados con la enfermedad presentes en los genes *PTPN22*, *VDR* y *TNF*. La estratificación genética que presentan las diferentes poblaciones en el mundo puede influir en dicha variabilidad.

**Objetivo.** Analizar la asociación de variantes genéticas de los genes *PTPN22*, *VDR* y *TNF* con nefritis lúpica en niños y su carácter de hereditarias en familias colombianas.

**Materiales y métodos.** Se llevó a cabo un estudio basado en familias con 46 tríos (caso, padre y madre). Se hizo la genotipificación de las variantes rs2476601 de *PTPN22*, rs361525 y rs1800629 del *TNF*, y TaqI [rs731236], Apal [rs7975232], BsmI [rs1544410] y FokI [rs2228570] del *VDR*, mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (*quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR). Se estimó el efecto de la transmisión del alelo de riesgo de padres a hijos y el desequilibrio de ligamiento de los loci *VDR* y *TNF*.

**Resultados.** Se observó que el alelo A de rs2476601 en *PTPN22* se distribuyó en 8,69 % (n=16) de los padres y en 19,5 % (n=18) de los casos, y que su transmisión de padres a hijos fue 17 veces mayor con relación al alelo G (p=0,028). Los polimorfismos de *TNF* y *VDR* no presentaron desequilibrio de transmisión. Las variantes TaqI, Apal y BsmI del *VDR* presentaron desequilibrio de ligamiento.

**Conclusión.** Estos hallazgos evidenciaron una asociación del polimorfismo rs2476601 de *PTPN22* con la nefritis lúpica en niños, determinada por su transmisión en el grupo de familias estudiadas.

**Palabras clave:** lupus eritematoso sistémico; nefritis lúpica; desequilibrio de ligamiento; estudios de asociación genética.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3247>

### Association of polymorphic variants of *PTPN22*, *TNF* and *VDR* genes in children with lupus nephritis: A study in Colombian family triads

**Introduction:** Systemic lupus erythematosus is an autoimmune disease in which the severity varies according to race, sex and age of onset. This variation is also observed in the genetic markers associated with the disease, including *PTPN22*, *VDR* and *TNF* genes. The genetic stratification in different populations worldwide can influence the variability.

**Objective:** To analyze the heritability of *PTPN22*, *VDR* and *TNF* genetic variants and their association with pediatric lupus nephritis in Colombian families.

**Materials and methods:** We conducted a family-based study including 46 triads (case, father and mother). The variants rs2476601 of *PTPN22*; rs361525 and rs1800629 of *TNF*, and TaqI [rs731236],

#### Contribución de los autores:

Gloria Garavito y Eduardo Egea: coordinación general del estudio e interpretación de los resultados

Luis Fang: análisis estadísticos e interpretación de los resultados

Clara Malagón, Carlos Olmos, Luz González, Pilar Guarnizo, Gustavo Aroca y Antonio Iglesias: componente clínico del proyecto

Guillermo López: interpretación de los resultados

Todos los autores participaron por igual en el desarrollo y la elaboración del manuscrito.

Apal [rs7975232], BsmI [rs1544410] and FokI [rs2228570] of *VDR* were genotyped by qPCR. The effects of overtransmission of the risk allele from parents to children and linkage disequilibrium at the *VDR* and *TNF* loci were estimated.

**Results:** We found that allele A of rs2476601 in *PTPN22* was distributed among 8.69 % (n=16) of the parents and 19.5 % (n=18) of the cases; this allele was overtransmitted from parents to children 17 times more often than the G allele (p=0.028). *TNF* and *VDR* polymorphisms did not exhibit transmission disequilibrium. *VDR* TaqI, Apal and BsmI variants exhibited linkage disequilibrium.

**Conclusion:** These findings showed an association between the *PTPN22* rs2476601 polymorphism and pediatric lupus nephritis due to its overtransmission in the group of families studied.

**Key words:** Lupus erythematosus, systemic; lupus nephritis; linkage disequilibrium; genetic association studies.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3247>

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad crónica de carácter autoinmunitario caracterizada por la producción de autoanticuerpos (1,2). Quienes lo padecen pueden presentar una amplia variabilidad clínica o de 'endotipos' debido al compromiso de múltiples sistemas del organismo. En diversos estudios se ha demostrado que el compromiso orgánico y la gravedad de la enfermedad varían según el grupo étnico, el sexo y la edad de aparición (3,4). Se desconocen las causas de la enfermedad, pero se ha demostrado su vínculo con factores hormonales, genéticos y ambientales (5-7).

Por otra parte, entre 10 y 25 % de los pacientes adultos con lupus eritematoso sistémico pueden desarrollar insuficiencia renal, mientras que cerca de 75 % de los niños que lo padecen desarrollan algún grado de compromiso renal y, en algún momento de su evolución, aparece la nefritis lúpica (8). Las formas proliferativas de esta condición, es decir, los tipos III, IV y V, son las más comunes y, a la vez, las más graves, pues pueden evolucionar hacia una nefropatía terminal (9).

En reportes previos, se ha demostrado el papel de algunas variantes genéticas presentes en los genes *PTPN22* (10,11), *VDR* (12,13), *TNF* (14,15), y *HLA* (16,17), entre otros (18), como factores de riesgo o de protección en los diferentes endotipos de lupus eritematoso sistémico, incluida la nefritis lúpica. La mayoría de estos estudios emplean un diseño de asociación genética de casos y controles para la detección de factores genéticos asociados a una enfermedad en particular (19,20). El grado de asociación detectado con este método depende

de que el alelo identificado confiera propensión a la enfermedad, aunque también puede ocurrir que el alelo se encuentre en desequilibrio de ligamiento con un alelo del verdadero gen de propensión (21). Este enfoque metodológico puede arrojar resultados erróneos debido a variables de confusión, como la estratificación poblacional, especialmente cuando se estudian individuos con características multiétnicas como en el caso de las poblaciones latinoamericanas (22). Los estudios basados en familias ofrecen una alternativa exenta del efecto de confusión debido a dicha estratificación poblacional (23).

En el diseño de tríos de casos y padres, se seleccionan las familias a partir del caso índice y se obtiene información de ambos padres, quienes presentan una estratificación poblacional similar a la de su descendencia (24,25). En este tipo de estudios, se puede emplear el test de desequilibrio de transmisión, con el cual se evalúa la transmisión de alelos de los padres heterocigotos a los hijos enfermos (26). En pocos estudios se ha empleado este tipo de diseño en el estudio de marcadores genéticos asociados con la nefritis lúpica en niños, especialmente en Colombia.

El objetivo del presente estudio consistió en analizar la asociación de variantes genéticas de los genes *PTPN22*, *VDR* y *TNF- $\alpha$*  con la nefritis lúpica en niños y su carácter de hereditarias en tríos de familias colombianas con un caso índice de dicha enfermedad.

## Materiales y métodos

### Población de estudio

Se hizo un estudio de asociación genética con 46 tríos en un contexto familiar. Solo se incluyeron familias en las que ni el padre ni la madre referían antecedentes personales de enfermedades autoinmunitarias. El diagnóstico de lupus eritematoso

#### Correspondencia:

Gloria Garavito, Universidad del Norte, Km 5 vía Puerto Colombia, Barranquilla, Colombia  
Teléfono: (575) 350 9486; fax (575) 359 8852  
ggaravit@uninorte.edu.co

Recibido: 22/02/16; aceptado: 03/08/16

sistémico se determinó por la presencia de, al menos, cuatro de los 11 criterios propuestos por el *American College of Rheumatology*, presentes en secuencia o simultáneamente durante el tiempo de observación del individuo (27). La edad de inicio de los síntomas de la falla renal se tuvo en cuenta para establecer la presencia de nefritis lúpica en los niños.

### **Extracción de ADN genómico**

Un equipo compuesto por flebotomistas, investigadores y médicos, se encargó de recolectar 10 ml de sangre venosa periférica por participante en tubos Vacutainer con EDTA dipotásico (Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, USA, Ref: 367856), para la obtención de suero y posterior extracción de ADN genómico. Las muestras se tomaron en ayunas, antes de las 7 a.m.

El ADN se extrajo a partir de la fracción leucoplaquetaria (*buffy coat*) de la muestra de sangre anticoagulada, usando el protocolo de *salting out* modificado y sometiéndola a precipitación con perclorato de sodio (28). La concentración y la calidad del ADN se midieron mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000/2000c (ThermoScientific™, Waltham, MA, USA). Las muestras de ADN genómico y de suero se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -70 °C hasta su posterior análisis.

### **Genotipificación de los polimorfismos de nucleótido simple**

Se hizo la genotipificación de los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) rs2476601 de *PTPN22*, rs1800629 y rs361525 del *TNF- $\alpha$* , y TaqI [rs731236 A/G], ApaI [rs7975232 A/C], FokI [rs2228570 A/G] y BsmI [rs1544410 C/T] del *VDR* mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando los estuches comerciales TaqMan® SNP Genotyping (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), en un volumen total por reacción de 5  $\mu$ l (2,4  $\mu$ l de ADN en una concentración aproximada de 10 ng/ $\mu$ l, 2,5  $\mu$ l de Master Mix-2x y 0,125  $\mu$ l de sondas Taqman Genotyping-40x específicas de cada SNP). Todas las reacciones de PCR se hicieron por duplicado. El programa de ciclos consistió en uno inicial de 10 minutos a 95 °C, seguido por 40 de 15 segundos a 92 °C y un minuto a 60 °C. La asignación genotípica se hizo automáticamente mediante la aplicación *Allelic Discrimination* del sistema Applied Biosystems, con una calidad de amplificación mayor o igual a 90 % por muestra. Todas las muestras se analizaron

por duplicado para evitar errores de genotipificación; además, se verificó que no se presentaran inconsistencias mendelianas.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico consistió en determinar las frecuencias alélicas y genotípicas mediante el programa estadístico SPSS®, versión 20 (IBM SPSS Statistics 20®; IBM Corp., USA). A estas frecuencias se les estimó la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W), empleando el programa Arlequín, versión 3.5.

La segregación de los SNP de *PTPN22*, *VDR* y *TNF* se hizo mediante pruebas estadísticas del desequilibrio de ligamiento, como son el  $D'$  y el  $r^2$ , y la transmisión de estas variantes de los padres a los hijos mediante el test de desequilibrio de transmisión. Para estos análisis, se empleó el programa Haploview 4.1. La significación estadística se estableció como un valor de  $p < 0,05$ .

### **Consideraciones éticas**

Todos los participantes mayores de edad aprobaron, mediante consentimiento informado escrito, su participación voluntaria en el estudio, así como la de sus hijos, autorizando la obtención de muestras biológicas (sangre venosa periférica, ADN genómico y material genético). El Comité de Ética de la División de Ciencias de la Salud de la Universidad del Norte aprobó la realización del estudio.

### **Resultados**

Los casos índice presentaron un promedio de edad de  $16,19 \pm 3,48$  años. La aparición del lupus eritematoso sistémico se dio, en promedio, a los  $4,47 \pm 3,5$  años. Por otra parte, en 35,8 % de estos casos se registraron antecedentes de enfermedad autoinmunitaria en varios miembros de las familias. Se encontró que la distribución de la enfermedad dependía del sexo, con una frecuencia mayor en niñas: 73,9 % ( $n=34$ ) (cuadro 1).

### **Distribución de las variantes genéticas de *PTPN22*, *TNF* y *VDR* en las familias de estudio**

En cuanto a la distribución alélica de estas variantes, se observó que el alelo A del polimorfismo rs2476601 del *PTPN22* se distribuyó en 8,69 % ( $n=16$ ) de los padres y aumentó a 19,5 % ( $n=18$ ) en los casos. Este efecto también se vio reflejado en la frecuencia del genotipo homocigoto AA y del heterocigoto AG, distribuido en 8,6 % y 21,7 % de los casos índice, respectivamente. Se encontró que el polimorfismo exhibía equilibrio genético

**Cuadro 1.** Descripción de los casos índice

	n=46	%
Sexo		
Masculino	12	26,10
Femenino	34	73,90
Edad (media ± DE)	16,19 ± 3,48	
Inicio del lupus eritematoso sistémico (años)	4,47 ± 3,53	
Tiempo con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (años)	11,91 ± 2,88	
Antecedentes familiares de enfermedad autoinmunitaria	33	35,87

DE: desviación estándar

de Hardy-Weinberg en los padres ( $p=0,689$ ), mas no así en la descendencia ( $p=0,035$ ). En cuanto a las variantes de *TNF- $\alpha$*  y *VDR*, estas mostraron distribuciones similares entre padres e hijos. Las variantes del *TNF- $\alpha$*  no se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg en los casos índice (cuadro 2).

### **Desequilibrio de ligamiento y transmisión genética de *PTPN22*, *TNF* y *VDR***

Dado que presentaron más de una variante en la genotipificación, se estimó el desequilibrio de ligamiento de los SNP de *TNF- $\alpha$*  y *VDR*, lo cual permitió detectar un bloque de 1 kb de distancia genómica entre los SNP rs731236, rs7975232 y rs1544410 mediante el método de *solid spine*, el cual abarca la región comprendida entre las posiciones 46.525.024 y 46.526.102 del cromosoma 12 del gen *VDR*. Estos tres polimorfismos demostraron un desequilibrio significativo, con un  $D'$  de 0,807 y un  $r^2$  de 0,538 (figura 1). En cuanto al *TNF*, se observó la segregación de los dos polimorfismos en un bloque de 3 kb (figura 2).

Asimismo, se evaluó la posibilidad de heredar los polimorfismos determinados por genotipificación mediante el test de desequilibrio de transmisión y se demostró que el alelo A de rs2476601 en el *PTPN22* se había transmitido de los padres a la descendencia con nefritis lúpica, con una razón de 17 a 6 veces más que el alelo G ( $p=0,028$ ). La transmisión de padres a hijos de los demás polimorfismos no fue significativa (cuadro 3).

### **Discusión**

Este es uno de los pocos estudios en Colombia con un diseño basado en las familias para evaluar la asociación y la posibilidad de heredar variantes genéticas en los *loci PTPN22*, *TNF* y *VDR* con propensión al endotipo de nefritis lúpica del lupus eritematoso sistémico en niños. Este tipo de diseño es ideal en el estudio de enfermedades

**Cuadro 2.** Frecuencia genotípica y alélica de los SNP de *PTPN22*, *TNF* y *VDR*

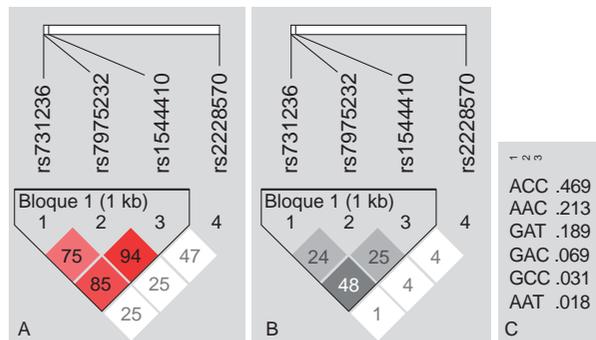
	Tríos					
	Padres		H-W†	Casos		H-W†
	n=92	%		n=46	%	
<i>PTPN22</i> [rs2476601]						
AA	1	1,08		4	8,69	
AG	14	15,2		10	21,73	
GG	77	83,6		32	69,5	
A	16	8,69	0,689	18	19,56	0,035*
G	168	91,30		74	80,43	
<i>TNF</i> [rs361525]						
AA	1	1,08		---	---	
AG	12	13,04		7	15,21	
GG	79	85,86		39	84,78	
A	14	7,60	0,488	7	7,60	0,00*
G	170	92,39		85	92,39	
<i>TNF</i> [rs1800629]						
AA	---	---		1	2,17	
AG	14	15,2		3	6,52	
GG	78	84,7		42	91,3	
A	14	7,60	0,00*	5	5,43	0,013*
G	170	92,39		87	94,56	
<i>VDR</i> /TaqI [rs731236]						
AA	48	52,1		24	52,1	
AG	34	36,9		17	36,9	
GG	10	10,8		5	10,86	
A	130	70,6	0,296	65	70,65	0,460
G	54	29,34		27	29,34	
<i>VDR</i> /ApaI [rs7975232]						
AA	21	22,82		10	22,72	
AC	48	52,17		23	52,27	
CC	23	25,0		11	25,0	
A	90	48,91	0,673	43	48,86	0,760
C	94	51,08		45	51,13	
<i>VDR</i> /BsmI [rs1544410]						
CC	1	1,09		2	4,44	
CT	38	41,7		18	40,0	
TT	52	57,14		25	55,5	
C	40	21,97	0,037*	22	24,4	0,578
T	142	78,02		68	75,5	
<i>VDR</i> /FokI [rs2228570]						
AA	11	11,95		8	17,39	
AG	53	57,60		22	47,82	
GG	28	30,43		16	34,78	
A	75	40,76	0,064	38	41,3	0,926
G	109	59,23		54	58,6	

†: test de equilibrio de Hardy-Weinberg mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov

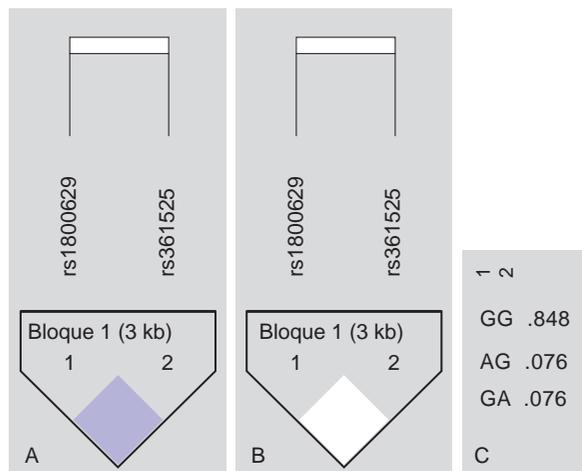
\*:  $p<0,05$ 

que aparecen a temprana edad (29). Como se pudo observar en este estudio, la edad promedio de inicio de la enfermedad fue a los cuatro años, aproximadamente, lo cual aumenta la probabilidad de que se produzca daño renal (8).

Se han hecho algunos estudios en población colombiana sobre la asociación entre el lupus eritematoso sistémico y los polimorfismos de *PTPN22*



**Figura 1.** Mapa *pair-wise* del desequilibrio de ligamiento de los SNP del *VDR* evaluados en los tríos. Se detectó un bloque mediante el método *solid spine* que recogió la información genética de los SNP TaqI, ApaI y BsmI. **A)** Se muestra un desequilibrio de ligamiento más marcado entre los polimorfismos rs731236, rs7975232 y rs1544410, con un  $D'$  de 0,852 y una puntuación LOD de 16,32. **B)** En el bloque 1 se observa un  $r^2$  de 0,485. **C)** Se observa la frecuencia haplotípica del bloque 1.



**Figura 2.** Mapa *pair-wise* del desequilibrio de ligamiento de los SNP de *TNF* evaluados en los tríos. Se detectó un bloque mediante el método *solid spine* que recogió la información genética de los dos SNP de *TNF* caracterizados por genotipificación. **A)** Se muestra un evidente desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs1800629 y rs361525 con un  $D'$  de 1,0 y una puntuación LOD de 0,5. **B)** Se observa un  $r^2$  de 0,007. **C)** Se describe la frecuencia haplotípica del bloque.

(10,11), *VDR* (12,13) y *TNF* (14,15). Sin embargo, hasta la fecha solo en el estudio de Ramírez, et al. (11), se había reportado la asociación del polimorfismo rs2476601, también conocido como C1858T, del gen *PTPN22*. En dicho estudio, los autores encontraron una asociación significativa entre dicho SNP y la propensión a esta enfermedad y a la artritis reumatoide. Cabe aclarar que, en ese estudio, se empleó un diseño de casos y controles con individuos de diferentes zonas de Colombia. En el presente estudio, se corroboró la asociación

**Cuadro 3.** Transmisión de los SNP de *PTPN22*, *TNF* y *VDR* según el análisis por tríos

	SNP	Alelo transmitido	T:U	p
<i>PTPN22</i>				
	rs2476601	A	17:6	0,028*
<i>TNF</i>				
	rs1800629	G	9:5	0,285
	rs361525	---	6:6	1,0
	Haplotipos	Frecuencia		
	GG	0,848	14:10	0,414
	AG	0,076	5:9	0,285
	GA	0,076	6:6	1,000
<i>VDR</i>				
	rs731236	---	17:17	1,000
	rs7975232	A	23:22	0,881
	rs1544410	T	20:17	0,621
	rs2228570	A	27:26	0,890
	Haplotipos	Frecuencia		
	ACCG	0,239	20.1 : 19.0	0,8668
	ACCA	0,230	17.2 : 19.4	0,7148
	GATG	0,139	14.4 : 9.6	0,3284
	AACG	0,131	12.6 : 9.7	0,5508
	AACA	0,081	8.7 : 6.8	0,6338
	GACG	0,055	1.1 : 7.8	0,023*
	GATA	0,050	4.1 : 4.8	0,8033
	GCCA	0,023	2.8 : 1.4	0,4917
	AATG	0,018	0.5 : 2.9	0,1915
	GACA	0,015	2.4 : 0.8	0,3727

T: alelo que se transmite de padres a hijos  
 U: alelo que no se transmite de padres a hijos  
 \*: p<0,05

observada para este polimorfismo y la nefritis lúpica en niños de familias colombianas; además, se describió la forma en que el alelo de riesgo es heredado de padres a hijos. En las publicaciones sobre marcadores de propensión y nefritis lúpica en niños, no se han presentado resultados que asocien este polimorfismo con un efecto funcional, como tampoco se ha encontrado su asociación con algún subgrupo de la enfermedad.

En este estudio, no se evidenció ninguna asociación entre las variables genéticas estudiadas de los *loci* de *TNF* y *VDR* con el endotipo de la nefritis lúpica en niños; además, estas mostraron un comportamiento de segregación similar entre los alelos. En Colombia, no se han reportado datos sobre marcadores de propensión relacionados con estas variantes y esta enfermedad. Como ya se mencionó, la variabilidad observada en los resultados de los diversos estudios a nivel mundial, muy probablemente, se deba a la estratificación poblacional de cada muestra de estudio. Sin embargo, en el presente estudio, las variantes TaqI, ApaI y BsmI del *VDR* exhibieron un desequilibrio de ligamiento, lo cual sugiere que, a pesar de no estar

relacionados directamente con la enfermedad, si son cercanos a otros marcadores asociados con la nefritis lúpica en niños.

Entre las limitaciones de este estudio cabe señalar un tamaño de muestra relativamente pequeño, debido a la frecuencia del endotipo estudiado y la disponibilidad de las muestras biológicas del trío completo, lo cual, aunado a la posible estratificación deficiente de la población estudiada, explicaría el desequilibrio genético de Hardy-Weinberg en los SNP de *VDR* y *TNF* observados en padres e hijos. Por lo tanto, los resultados aquí presentados son aplicables exclusivamente a esta muestra de familias colombianas.

Puede concluirse, entonces, que en el caso particular de la nefritis lúpica en los niños de las familias estudiadas, el alelo A del polimorfismo rs2476601 del gen *PTPN22*, heredado de sus padres, presentó una asociación directa con la enfermedad. Estos resultados sirven de base para el planteamiento de futuros estudios epidemiológicos de asociación con un mayor número de familias y de grupos multiétnicos similares a la población colombiana.

### Agradecimientos

A Colciencias y a la Universidad del Norte, por sus aportes a la financiación de esta investigación. A nuestros pacientes, por su colaboración. A Nicole Samuel Pereira Sanandrés, por la revisión del manuscrito.

### Conflicto de intereses

Los autores del presente estudio declaran no tener conflicto de intereses con respecto al estudio.

### Financiación

Colciencias (contrato 652-2009) y Universidad del Norte

### Referencias

- Bonanni A, Vaglio A, Bruschi M, Sinico RA, Cavagna L, Moroni G, et al.** Multi-antibody composition in lupus nephritis: Isotype and antigen specificity make the difference. *Autoimmun Rev.* 2015;14:692-702. <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2015.04.004>
- Mohan C, Putterman C.** Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11:329-41. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2015.33>
- Pons-Estel BA, Catoggio LJ, Cardiel MH, Soriano ER, Gentiletti S, Villa AR, et al.** The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: Ethnic and disease heterogeneity among "Hispanics". *Medicine (Baltimore).* 2004;83:1-17. <http://dx.doi.org/10.1097/01.md.0000104742.42401.e2>
- Ramírez-Gómez LA, Uribe-Uribe O, Osio-Uribe O, Grisales-Romero H, Cardiel MH, Wojdyla D, et al.** Childhood systemic lupus erythematosus in Latin America. The GLADEL experience in 230 children. *Lupus.* 2008;17:596-604. <http://dx.doi.org/10.1177/0961203307088006>
- Makashir SB, Kottyan LC, Weirauch MT.** Meta-analysis of differential gene co-expression: Application to lupus. *Pac Symp Biocomput.* 2015;443-54. [http://dx.doi.org/10.1142/9789814644730\\_0042](http://dx.doi.org/10.1142/9789814644730_0042)
- Dema B, Charles N.** Advances in mechanisms of systemic lupus erythematosus. *Discov Med.* 2014;17:247-55.
- Kunz M.** Lupus erythematosus. Part I: Epidemiology, genetics and immunology. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2013;11:709-19. <http://dx.doi.org/10.1111/ddg.12165>
- Sinha R, Raut S.** Pediatric lupus nephritis: Management update. *World J Nephrol.* 2014;3:16-23. <http://dx.doi.org/10.5527/wjn.v3.i2.16>
- Ortega LM, Schultz DR, Lenz O, Pardo V, Contreras GN.** Review: Lupus nephritis: Pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. *Lupus.* 2010;19:557-74. <http://dx.doi.org/10.1177/0961203309358187>
- Shi L, Wei Y, Xun W, Han D.** Meta-analysis of the correlation between *PTPN22* gene polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Asia Pac J Public Health.* 2013;25(Suppl.4):22S-9. <http://dx.doi.org/10.1177/1010539513496268>
- Ramírez M, Quintana G, Díaz-Gallo LM, Caminos J, Garcés M, Cepeda L, et al.** The *PTPN22* C1858T variant as a risk factor for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus but not for systemic sclerosis in the Colombian population. *Clin Exp Rheumatol.* 2012;30:520-4.
- Hu W, Niu G, Lin Y, Chen X, Lin L.** Impact of the polymorphism in vitamin D receptor gene *Bsm1* and the risk of systemic lupus erythematosus: An updated meta-analysis. *Clin Rheumatol.* 2015;35:927-34. <http://dx.doi.org/10.1007/s10067-015-3157-x>
- Mao S, Huang S.** Association between vitamin D receptor gene *Bsm1*, *FokI*, *Apal* and *TaqI* polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Rheumatol Int.* 2014;34:381-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-013-2898-6>
- Pan HF, Leng RX, Wang C, Qin WZ, Chen LL, Zha ZQ, et al.** Association of *TNF-alpha* promoter-308 A/G polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Rheumatol Int.* 2012;32:2083-92. <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-011-1924-9>
- Zou YF, Feng XL, Pan FM, Su H, Tao JH, Ye DQ.** Meta-analysis of *TNF-alpha* promoter - 238A/G polymorphism and SLE susceptibility. *Autoimmunity.* 2010;43:264-74. <http://dx.doi.org/10.3109/08916930903509049>
- Niu Z, Zhang P, Tong Y.** Value of HLA-DR genotype in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: A meta-analysis. *Int J Rheum Dis.* 2015;18:17-28. <http://dx.doi.org/10.1111/1756-185X.12528>
- Pan CF, Wu CJ, Chen HH, Dang CW, Chang FM, Liu HF, et al.** Molecular analysis of HLA-DRB1 allelic associations with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis in Taiwan. *Lupus.* 2009;18:698-704. <http://dx.doi.org/10.1177/0961203308101955>

18. **Ghodke-Puranik Y, Niewold TB.** Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015;64:125-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.004>
19. **Lewis CM.** Genetic association studies: Design, analysis and interpretation. *Brief Bioinform.* 2002;3:146-53. <http://dx.doi.org/10.1093/bib/3.2.146>
20. **Campbell H, Rudan I.** Interpretation of genetic association studies in complex disease. *Pharmacogenomics J.* 2002;2:349-60. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.tpj.6500132>
21. **Robinson MR, Wray NR, Visscher PM.** Explaining additional genetic variation in complex traits. *Trends Genet.* 2014;30:124-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2014.02.003>
22. **Kaufman JS, Cooper RS.** Commentary: Considerations for use of racial/ethnic classification in etiologic research. *Am J Epidemiol.* 2001;154:291-8. <http://dx.doi.org/10.1093/aje/154.4.291>
23. **Jenkins JM, McGowan P, Knafo-Noam A.** Parent-offspring transaction: Mechanisms and the value of within family designs. *Horm Behav.* 2016;77:53-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.06.018>
24. **Infante-Rivard C, Mirea L, Bull SB.** Combining case-control and case-trio data from the same population in genetic association analyses: Overview of approaches and illustration with a candidate gene study. *Am J Epidemiol.* 2009;170:657-64. <http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwp180>
25. **Santos JL, Pérez F, Carrasco E, Albala C.** Uso de tríos caso-padres en estudios epidemiológicos de asociación entre polimorfismos genéticos y enfermedades complejas. *Rev Med Chil.* 2002;130:1307-15. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872002001100016>
26. **Guo W, Fung WK.** Combining the case-control methodology with the small size transmission/disequilibrium test for multiallelic markers. *Eur J Hum Genet.* 2005;13:1007-12. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201453>
27. **Hochberg MC.** Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1725. [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(199709\)40:9<1725::AID-ART29>3.0.CO;2-Y](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(199709)40:9<1725::AID-ART29>3.0.CO;2-Y)
28. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
29. **Laird NM, Lange C.** Family-based designs in the age of large-scale gene-association studies. *Nat Rev Genet.* 2006;7:385-94. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1839>

BRIEF COMMUNICATION

## Haplotypes in *CCR5-CCR2*, *CCL3* and *CCL5* are associated with natural resistance to HIV-1 infection in a Colombian cohort

Jorge A. Vega<sup>1,2,3</sup>, Simón Villegas-Ospina<sup>1</sup>, Wbeimar Aguilar-Jiménez<sup>1</sup>,  
María T. Rugeles<sup>1</sup>, Gabriel Bedoya<sup>3</sup>, Wildeman Zapata<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Grupo Inmunovirología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Laboratorio de Genética, Dirección Regional Noroccidente, Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Medellín, Colombia

<sup>3</sup> Genética Molecular, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>4</sup> Grupo Infettare, Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia, Medellín, Colombia

**Introduction:** Variants in genes encoding for HIV-1 co-receptors and their natural ligands have been individually associated to natural resistance to HIV-1 infection. However, the simultaneous presence of these variants has been poorly studied.

**Objective:** To evaluate the association of single and multilocus haplotypes in genes coding for the viral co-receptors *CCR5* and *CCR2*, and their ligands *CCL3* and *CCL5*, with resistance or susceptibility to HIV-1 infection.

**Materials and methods:** Nine variants in *CCR5-CCR2*, two SNPs in *CCL3* and two in *CCL5* were genotyped by PCR-RFLP in 35 seropositive (cases) and 49 HIV-1-exposed seronegative Colombian individuals (controls). Haplotypes were inferred using the Arlequin software, and their frequency in individual or combined loci was compared between cases and controls by the chi-square test. A p' value <0.05 after Bonferroni correction was considered significant.

**Results:** Homozygosis of the human haplogroup (HH) E was absent in controls and frequent in cases, showing a tendency to susceptibility. The haplotypes C-C and T-T in *CCL3* were associated with susceptibility (p'=0.016) and resistance (p'<0.0001) to HIV-1 infection, respectively. Finally, in multilocus analysis, the haplotype combinations formed by HHC in *CCR5-CCR2*, T-T in *CCL3* and G-C in *CCL5* were associated with resistance (p'=0.006).

**Conclusion:** Our results suggest that specific combinations of variants in genes from the same signaling pathway can define an HIV-1 resistant phenotype. Despite our small sample size, our statistically significant associations suggest strong effects; however, these results should be further validated in larger cohorts.

**Key words:** HIV-1; immunity, innate; phenotype; haplotypes; Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3237>

### Los haplotipos en *CCR5-CCR2*, *CCL3* y *CCL5* se asocian con resistencia natural a la infección por el HIV-1 en una cohorte colombiana

**Introducción.** Algunas variantes en genes que codifican los correceptores del HIV-1 y sus ligandos se han asociado individualmente a la resistencia natural frente a dicha infección. Sin embargo, su presencia simultánea ha sido poco estudiada.

**Objetivo.** Evaluar la asociación de haplotipos individuales y multilocus en genes que codifican los correceptores virales *CCR5* y *CCR2* y sus ligandos *CCL3* y *CCL5* con la resistencia o la propensión a la infección por el HIV-1.

**Materiales y métodos.** Nueve variantes en *CCR5-CCR2*, dos en *CCL3* y dos en *CCL5* fueron genotipificadas mediante reacción en cadena de la polimerasa de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR-RFLP*) en 35 individuos seropositivos (casos) y 49 seronegativos expuestos (controles) de Colombia. Los haplotipos se infirieron utilizando el programa Arlequin, y su frecuencia individual o combinada se comparó en los casos y los controles mediante la prueba de ji al cuadrado. Se consideró significativo un valor de p'<0,05 después de la corrección de Bonferroni.

#### Author's contributions:

María T. Rugeles: conception and design of experiments

Gabriel Bedoya: conception and design of experiments; data analysis

Jorge A. Vega: conduction of experiments and data analysis

Simón Villegas-Ospina, Wbeimar Aguilar-Jiménez, Wildeman Zapata: data analysis and results interpretation

All authors participated in the writing of the paper.

**Resultados.** La homocigosis del haplogrupo humano (HH) E estaba ausente en los controles y era frecuente en los casos, es decir, con tendencia hacia la propensión. Los haplotipos C-C y T-T en *CCL3* se asociaron con la propensión ( $p'=0,016$ ) y la resistencia ( $p'<0,0001$ ), respectivamente. Por último, en el análisis multilocus, el haplotipo combinado formado por HHC en *CCR5-CCR2*, T-T en *CCL3* y G-C en *CCL5* se asoció con la resistencia ( $p'=0,006$ ).

**Conclusión.** Los resultados de este estudio sugieren que ciertas combinaciones específicas de variantes en los genes de una misma vía de señalización pueden definir un fenotipo resistente al HIV-1. Aunque el tamaño de la muestra era pequeño, las asociaciones estadísticamente significativas sugieren un efecto considerable; sin embargo, estos resultados deben validarse en cohortes de mayor tamaño.

**Palabras clave:** HIV-1, inmunidad innata; fenotipo; haplotipos; Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3237>

Natural resistance to HIV-1 infection exhibited by some individuals who, despite being in direct contact with the virus, show no evidence of infection (known as HIV-1-exposed seronegative, HESN) has been associated, among others, to polymorphisms in genes that encode the HIV-1 co-receptors *CCR5* and *CXCR4*, as well as the alternative co-receptor *CCR2* (1).

Seven major haplotypes have been described based on unique combinations of polymorphic sites in *CCR5* and the adjacent *CCR2* gene, which were phylogenetically established and named as human haplogroups (HH) A, B, C, D, E, F (F1, F2) and G (G1, G2)(2,3). Some of these have been associated with either resistance (HHG2, HHA, HHF2) (2,4,5) or increased susceptibility to HIV-1 infection and accelerated AIDS progression (HHE) (6-8). Furthermore, polymorphisms located in promoter or intronic regions of the natural ligands of *CCR5*, *CCL3* (also known as MIP-1 $\alpha$ , encoded by *CCL3*) and *CCL5* (also known as RANTES, encoded by *CCL5*) could modify the secretion levels of these peptides further influencing the resistance or susceptibility (R/S) to HIV-1 infection by competition with the *CCR5* co-receptor (3).

In this study, we determined the association of multilocus haplotypes formed by variants on the promoter and coding regions of the *CCR5-CCR2* locus, and the *CCL3* and *CCL5* genes with R/S to HIV-1 infection in a cohort of serodiscordant couples from Colombia.

## Materials and methods

### Study group

Samples were taken from a cohort of serodiscordant couples previously recruited at the *Hospital San Vicente Fundación* in Medellín that included 49 (17 men, 32 women) HESNs and 35 (31 men, four women) seropositive (SP) individuals. The selection criteria for HESNs were previously described (9) as absence of anti-p24 antibodies during at least six months of follow-up, in which at least two sexual intercourses occurred per week with an HIV-1 positive individual. For all cases, the HIV-1 status was tested by ELISA (Abbot AxSYM System) and confirmed through western blot (NewLab blot) following the manufacturer's instructions.

This study was approved by the bioethics board of the *Universidad de Antioquia's Instituto de Investigaciones Médicas* and all participants signed an informed consent.

### Genotype analysis

DNA was obtained from peripheral blood using the phenol-chloroform method. The genotyping of the 32-base-pair deletion ( $\Delta 32$ , rs333) on *CCR5* was performed by conventional PCR as previously described (9). The identification of SNPs in the selected genes (-2733A>G [rs2856758], -2554G>T [rs2734648], -2459G>A [rs1799987], -2135T>C [rs1799988], -2132C>T [rs41469351], -2086A>G [rs1800023] and -1835C>T [rs1800024] in *CCR5*; 190G>A [64Val>Ile, rs1799864] in *CCR2*; 73+40C>T [rs35511254] and 74-333C>T [rs111235874] in *CCL3*; -403G>A [rs2107538] and -28C>G [rs2280788] in *CCL5*) was performed by PCR-RFLP using the oligonucleotides, restriction enzymes and protocols previously reported by González, et al. (2,3). PCR reactions were performed on 25  $\mu$ l final mix containing 2.5  $\mu$ l 10X reaction buffer (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany), 0.2  $\mu$ l recombinant Taq polymerase 5 IU/ $\mu$ l (Thermo

Corresponding author:

Wildeman Zapata, Grupo Inmunovirología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Calle 70 N° 52-21, Medellín, Colombia  
Telephone/Fax: (574) 219 6482  
wzbuiles@gmail.com

Received: 11/02/16; accepted: 29/09/16

Scientific), 1 µl primers 25 mM and 2 µl DNA 8 µg/ml. Endonuclease digestion was performed on 13 µl of amplification products with 0.2 µl restriction endonucleases 10 IU/µl (Thermo Scientific) and 1.5 µl 10X reaction buffer (Thermo Scientific) following the protocols reported by González, *et al.* (2,3). PCR and endonuclease digestion products were checked on 1.5% and 2.5% agarose gels, respectively.

### Statistical analysis

Hardy-Weinberg equilibrium and genotype and allele frequencies were calculated using the GENPOP software, v. 3.4 (10). Most probable haplotypes were generated through a maximum likelihood test using the Arlequin software, v. 3.5(11) and haplogroups were defined according to previous reports (2,5). The DnaSP software v.5 (12) was used to calculate linkage disequilibrium and haplotype frequencies. All comparisons were performed in the Graphpad Prism 6.05 software using either the chi-square or the Fisher exact test, both with Bonferroni correction for multiple comparisons (referred to as  $p'$ ), based on the number of principal haplotypes (with a frequency  $>0.05$ ) as previously described (13). A corrected  $p'$  value ( $p \times$  number of comparisons per group)  $<0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### Demographic data

In this study we included samples from 49 HESN and 35 SP individuals of a previously defined cohort of serodiscordant couples (including heterosexual and homosexual couples, as well as SP individuals with more than one HESN sexual partner). In our samples, 17 males and 32 females corresponded to the HESN group, whereas 31 males and four females corresponded to the SP group. The mean age was 35 and 31 years for HESN and SP, respectively. The time of HIV-1 exposure among HESN individuals ranged between six months and four years. No genetic structure between cases and controls was expected, as the population was recruited in Medellín, whose population has been previously demonstrated to be homogeneous given its history of isolation (14,15).

### Haplotype distribution

The selected loci on *CCR5* and *CCR2* successfully genotyped in all individuals of our cohort. These variants were successfully grouped within the nine previously reported HHs. Of all HHs, only HHB was not found in this study. In total, we found 21 out of 36 expected haplogroup pairs (binomial coefficient  $C_{(8,2)}$ ), with the presence of 14 and 17 pairs in the

SP and HESN groups, respectively, C/E being the most frequent in both groups (0.257 for SPs and 0.265 for HESNs) (table 1).

For the two polymorphic sites of *CCL3*, only 18 and 21 samples successfully amplified both SNPs in HESNs and SPs, respectively. For these, the four possible haplotypes (2 loci  $\times$  2 variants in each) and seven out of ten expected haplotype pairs ( $C_{(4,2)}$ ) were observed in total, with four and five pairs in the SP and HESN groups, respectively. For the two polymorphic sites in *CCL5*, only 14 and 19 samples successfully amplified both SNPs in HESNs and SPs, respectively. For these, the four possible haplotypes and five out of ten expected haplotype pairs were observed in total, with four and five pairs found in the SP and HESN groups, respectively (table 1).

To determine the combined association of variants in HHs, *CCL5* and *CCL3* with R/S, a multilocus analysis was performed. Nonetheless, we could only use 14 samples in HESNs and 19 in SPs that successfully amplified and enzyme-digested the 13 tested loci. For this multilocus combination of HH, *CCL3* and *CCL5*, we found 26 haplotypes and 22 haplotype pairs in total, with ten haplotypes and 12 pairs in HESNs and 16 haplotypes and 15 pairs in SPs, out of 128 expected haplotypes ( $8_{HH} \times 4_{CCL3} \times 4_{CCL5}$ ) and 805 expected pairs ( $23_{HH} \times 7_{CCL3} \times 5_{CCL5}$ ) (table 2).

### Association analysis

Whereas none of the HHs were individually associated with R/S to HIV-1 infection, homozygosity of HHE (E/E) was only found in infected individuals, showing a non-significant tendency towards susceptibility ( $p=0.069$ ,  $p'>1$ ). For *CCL3*, the haplotype C-C was higher in SPs ( $p=0.004$ ,  $p'=0.016$ ) while haplotype T-T was higher in HESNs ( $p<0.0001$ ,  $p'<0.0001$ ). When paired, the combination CT-CC was associated with susceptibility ( $p=0.035$ ,  $p'=0.245$ ), whereas CT-TT was associated with resistance ( $p=0.002$ ,  $p'=0.014$ ). For *CCL5*, no significant differences were found for either haplotypes or pairs of haplotypes. After multilocus analysis we observed that the simultaneous presence of HHC with T-T in *CCL3* and G-C in *CCL5* was strongly associated with resistance to infection ( $p=0.0005$ ,  $p'=0.006$ ), and so was the paired combination of HHC/F2 with TT-TT in *CCL3* and AG-CC in *CCL5*; however, this latter situation did not remain significant after Bonferroni correction ( $p=0.040$ ,  $p'=0.880$ ). These results are summarized in table 3.

**Table 1.** Frequencies obtained for single locus analyses. Left columns indicate the frequency of the single copy of a given haplotype, whereas the right columns indicate the frequency of paired haplotypes. Haplotypes marked in bold reached statistical significance before Bonferroni correction.

Single haplotype copy	Freq. in SP	Freq. in HESN	Paired haplotype	Freq. in SP	Freq. in HESN
HH	n=35	n=49		n=35	n=49
A	0.014	0.020	A/C	0.028	0.021
B	0.000	0.000	A/E	0.000	0.021
C	0.243	0.337	C/C	0.028	0.062
D	0.071	0.020	C/D	0.057	0.000
E	0.314	0.245	C/E	0.257	0.265
F1	0.000	0.020	C/F2	0.057	0.164
F2	0.243	0.235	C/G1	0.000	0.041
G1	0.086	0.071	C/G2	0.028	0.041
G2	0.023	0.051	D/E	0.000	0.021
			D/F2	0.086	0.021
			E/E	0.086	0.000
			E/F1	0.000	0.021
			E/F2	0.143	0.122
			E/G1	0.057	0.041
			F1/F2	0.000	0.021
			F2/F2	0.057	0.062
			F2/G1	0.057	0.021
			F2/G2	0.028	0.000
			G1/G1	0.028	0.000
			G1/G2	0.000	0.021
			G2/G2	0.000	0.021
<b>CCL3</b>	n=21	n=18		n=21	n=18
<b>73+40</b>			<b>73+40</b>		
<b>C&gt;T</b>			<b>C&gt;T</b>		
<b>C</b>	<b>0.476</b>	<b>0.172</b>	<b>CT</b>	<b>0.619</b>	<b>0.278</b>
C	0.143	0.217	TT	0.000	0.167
T	0.381	0.217	<b>CT</b>	<b>0.000</b>	<b>0.389</b>
<b>T</b>	<b>0.000</b>	<b>0.394</b>	CT	0.143	0.111
			TT	0.000	0.056
			CC	0.143	0.000
			CC	0.095	0.000
<b>CCL5</b>	n=19	n=14		N=19	N=14
<b>-403</b>			<b>-403</b>		
<b>A&gt;G</b>			<b>A&gt;G</b>		
A	0.132	0.286	AG	0.211	0.500
A	0.079	0.071	AG	0.000	0.071
G	0.658	0.571	AG	0.211	0.143
G	0.132	0.071	GG	0.211	0.071
			GG	0.368	0.214

HH: human haplogroup; CCL3: C-C motif ligand 3; CCL5: C-C motif ligand 5; SP: HIV-1 seropositive; HESN: HIV-1 exposed seronegative

## Discussion

An important component involved in the R/S to HIV-1 infection is the expression levels of the CCR5 co-receptor on the cell. Previous studies have shown that several members of the NF- $\kappa$ B and c-Rel families have different binding and affinity across the CCR5 promoter region depending of both single SNPs and whole CCR5 HH, which regulate in different ways the mRNA levels, translation capacity and, ultimately, protein expression (16). Indeed, previous findings have shown that HHE has a higher promoter activity than

the ancestral and protective HHA, as measured by the luciferase activity test (17,18), leading to higher expression of CCR5 in individuals carrying HHE.

Although not significant after Bonferroni correction, probably due to our small sample size, our finding concerning HH E/E pointing towards susceptibility to HIV-1 infection is in concordance with previous studies showing an association with seroconversion and progression to AIDS (2,7,19), and could be explained by the expected higher expression of CCR5. An interesting point is that the susceptibility-associated effect of the HHE

**Table 2.** Frequencies obtained for multilocus haplotype analyses. Left columns indicate the frequency of the single copy of a given multilocus haplotype, whereas right columns indicate the frequency of paired multilocus haplotypes. Haplotypes marked in bold reached statistical significance before Bonferroni correction.

Single haplotype copy					Freq. in SP	Freq. in HESN	Paired haplotype				Freq. in SP	Freq. in HESN	
HH	CCL3		CCL5		n=19	n=14	HH	CCL3		CCL5		n=19	n=14
	73+40 C>T	74-333 C>T	-403 A>G	-28 C>G				73+40 C>T	74-333 C>T	-403 A>G	-28 C>G		
A	C	T	G	C	0.029	0.000	C/F2	CT	CT	AG	CC	0.053	0.067
C	T	C	A	C	0.002	0.000	<b>C/F2</b>	<b>TT</b>	<b>TT</b>	<b>AG</b>	<b>CC</b>	<b>0.000</b>	<b>0.268</b>
C	C	C	G	C	0.061	0.115	C/E	CT	CC	GG	CC	0.158	0.067
C	T	C	G	C	0.114	0.000	C/E	CT	TT	AG	GC	0.000	0.067
D	T	C	G	C	0.029	0.000	C/E	CT	TT	GG	CC	0.000	0.067
E	T	T	A	C	0.029	0.000	C/F2	CT	CT	AG	GC	0.000	0.067
E	T	C	A	G	0.088	0.000	G1/G2	CT	CC	GG	GC	0.000	0.067
E	T	T	A	G	0.029	0.000	E/F2	CT	CC	AG	GC	0.158	0.067
E	C	C	G	C	0.147	0.000	C/C	CT	TT	AG	CC	0.000	0.200
E	C	T	G	G	0.029	0.000	C/C	CT	CT	GG	CC	0.000	0.067
F2	C	C	A	C	0.057	0.000	C/F2	CT	CC	GG	CC	0.053	0.000
F2	C	C	G	C	0.235	0.000	G1/G1	CC	CT	AG	CC	0.053	0.000
F2	T	C	G	C	0.031	0.000	F2/F2	CC	CC	AG	CC	0.053	0.000
G1	C	T	A	C	0.029	0.000	F2/G1	CC	CC	GG	CC	0.053	0.000
G1	C	C	G	C	0.059	0.038	E/E	CT	CT	AG	GC	0.053	0.000
G1	T	C	G	G	0.029	0.000	E/G1	CT	CC	GG	GC	0.053	0.000
C	C	T	A	C	0.000	0.077	C/E	CT	CC	AG	GC	0.053	0.000
C	C	T	A	G	0.000	0.038	F2/F2	CT	CC	GG	CC	0.053	0.000
<b>C</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>0.000</b>	<b>0.308</b>	D/F2	CT	CC	GG	CC	0.053	0.000
E	C	T	G	C	0.000	0.038	E/E	CT	CT	AG	CC	0.053	0.000
E	T	C	G	C	0.000	0.077	A/C	CC	CT	GG	CC	0.053	0.000
E	T	T	G	G	0.000	0.038	E/F2	CC	CT	GG	GC	0.053	0.000
F2	T	C	A	C	0.000	0.038							
F2	T	T	A	C	0.000	0.115							
F2	C	C	A	G	0.000	0.077							
G2	T	C	G	G	0.000	0.038							

HH: human haplogroup; CCL3: C-C motif ligand 3; CCL5: C-C motif ligand 5; SP: HIV-1 seropositive; HESN: HIV-1 exposed seronegative

**Table 3.** Summary of single and multilocus haplotypes and pairs of haplotypes that reached statistical significance, both before and after Bonferroni correction. Frequencies in bold show the associated group, thus indicating susceptibility or resistance towards infection.

		Frequency		p-value	p'-value
		SP	HESN		
<b>CCL3</b>					
<b>73+40C&gt;T</b>	<b>74-333C&gt;T</b>				
T	T	0.000	<b>0.394</b>	< 0.0001	<0.0001
C	C	<b>0.476</b>	0.172	0.004	0.016
CT	TT	0.000	<b>0.111</b>	0.002	0.014
CT	CC	<b>0.619</b>	0.278	0.035	0.245
<b>HH</b>	<b>CCL3</b>	<b>CCL5</b>			
C	<b>73+40C&gt;T</b>	<b>74-333C&gt;T</b>	<b>-403A&gt;G</b>	<b>-28C&gt;G</b>	
C/F2	T	T	G	C	0.000
	TT	TT	AG	CC	0.000
					<b>0.308</b>
					0.0005
					0.040
					0.006
					0.880

SP: HIV-1 seropositive; HESN: HIV-1 exposed seronegative; HH: human haplogroup; CCL3: C-C motif ligand 3; CCL5: C-C motif ligand 5

has also been reported when paired with HHG2, leading to increased viral production *in vitro*, even though the latter carries the Δ32 mutation, possibly

due to restitution of the normal CCR5 levels over the cell membrane (20). Nevertheless, HHG2 has been effectively associated with protection and

decreased seroconversion when found in the homozygous state, or when paired with either HHA or HHF2 (19). These findings suggest that for HHs, the association with R/S depends on the effect of both copies carried by an individual over the overall expression of CCR5 on the cell membrane.

Our results regarding *CCL3*, where the T-T haplotype was associated with resistance and C-C with increased risk, contrast with previous reports where the presence of both C-C and T-T haplotypes were associated with resistance in Africans, whereas the absence of haplotype C-C in European Americans was associated to AIDS progression (3). Different ancestral backgrounds might be affecting how these variants synergize during exposure and infection. This becomes important since the Colombian population originated through admixture processes of Amerindian, European and African populations (14); therefore, a new genetic background might explain these results.

Even though we did not find an association in *CCL5* alone, as was previously reported (3), we did find an interesting association when variants in *CCR5/CCR2*, *CCL3* and *CCL5* were analyzed together, with the multilocus haplotype formed by HHC, T-T in *CCL3* and G-C in *CCL5* associated with resistance. Although two meta-analyses (21,22), with only one single variant in *CCL5* analyzed, have reported no association of any of them with R/S, our findings suggest that the simultaneous presence of variants on different genes involved in a common signaling or metabolic pathway (receptor and its ligands, in our case) can lead to a certain resistant or susceptible phenotype, probably due to the synergistic effect of these variants. We thus hypothesize that the resistance to viral infection in these cases might be due to the low expression of the viral specific co-receptors and high levels of their natural ligands competing for its use, and vice-versa, in the susceptible phenotype. However, as reviewed recently (23), functional studies are required to validate the function of intronic and promoter variants in *CCL3* and *CCL5* mRNA levels and stability and of the secretion of MIP-1 $\alpha$  and RANTES, as no data concerning these effects is available.

Despite the small sample size, mainly because of the exploratory characteristics of this study, the statistically significant results obtained here, even after the correction for multiple comparisons, support the accuracy of our results and suggest strong effects. Careful observations should, however, be considered, especially since the sample size of the

*CCL3*, *CCL5* and multilocus analyses fell short due to poor amplification products. Finally, to increase the strength of this study, our results should be validated in larger cohorts.

### Aknowledgements

The authors would like to thank all individuals who participated in this study, and Anne-Lise Haenni from the Université Paris-Diderot for her positive revision and English proof-reading.

### Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Funding

This work was supported by the *Universidad de Antioquia*, Colombia (*Sostenibilidad Grupo GENMOL and Grupo Inmunovirología*), and *Universidad Cooperativa de Colombia* (*Sostenibilidad 2014-2016, Grupo Infettare*).

### References

1. **Frade JM, Llorente M, Mellado M, Alcamí J, Gutiérrez-Ramos JC, Zaballos A, et al.** The amino-terminal domain of the CCR2 chemokine receptor acts as coreceptor for HIV-1 infection. *J Clin Invest.* 1997;100:497-502. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI119558>
2. **González E, Bamshad M, Sato N, Mummidi S, Dhanda R, Catano G, et al.** Race-specific HIV-1 disease-modifying effects associated with CCR5 haplotypes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:12004-9. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.21.12004>
3. **González E, Dhanda R, Bamshad M, Mummidi S, Geevarghese R, Catano G, et al.** Global survey of genetic variation in CCR5, RANTES, and MIP-1 alpha: Impact on the epidemiology of the HIV-1 pandemic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:5199-204. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.091056898>
4. **Ometto L, Zanchetta M, Mainardi M, De Salvo GL, Garcia-Rodríguez MC, Gray L, et al.** Co-receptor usage of HIV-1 primary isolates, viral burden, and CCR5 genotype in mother-to-child HIV-1 transmission. *AIDS.* 2000;14:1721-9.
5. **Zapata W, Aguilar-Jiménez W, Pineda-Trujillo N, Rojas W, Estrada H, Rugeles MT.** Influence of CCR5 and CCR2 genetic variants in the resistance/susceptibility to HIV in serodiscordant couples from Colombia. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013;29:1594-603. <http://dx.doi.org/10.1089/aid.2012.0299>
6. **Singh KK, Barroga CF, Hughes MD, Chen J, Raskino C, McKinney RE, et al.** Genetic influence of CCR5, CCR2, and SDF1 variants on human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-related disease progression and neurological impairment, in children with symptomatic HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2003;188:1461-72. <http://dx.doi.org/10.1086/379038>

7. **Nguyen L, Li M, Chaowanachan T, Hu DJ, Vanichseni S, Mock PA, et al.** CCR5 promoter human haplogroups associated with HIV-1 disease progression in Thai injection drug users. *AIDS*. 2004;18:1327-33. <http://dx.doi.org/10.1097/01.aids.0000131303.39957.15>
8. **Li M, Song R, Masciotra S, Soriano V, Spira TJ, Lal RB, et al.** Association of CCR5 human haplogroup E with rapid HIV type 1 disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2005;21:111-5. <http://dx.doi.org/10.1089/aid.2005.21.111>
9. **Rugeles MT, Solano F, Díaz FJ, Bedoya VI, Patiño PJ.** Molecular characterization of the CCR 5 gene in seronegative individuals exposed to human immunodeficiency virus (HIV). *J Clin Virol*. 2002;23:161-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532\(01\)00219-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532(01)00219-0)
10. **Rousset F.** Genepop'007: A complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour*. 2008;8:103-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
11. **Excoffier L, Lischer H.** Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010;10:564-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
12. **Librado P, Rozas J.** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009;25:1451-2. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
13. **Ma JZ, Beuten J, Payne TJ, Dupont RT, Elston RC, Li MD.** Haplotype analysis indicates an association between the DOPA decarboxylase (DDC) gene and nicotine dependence. *Hum Mol Genet*. 2005;14:1691-8. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddi177>
14. **Bedoya G, Montoya P, García J, Soto I, Bourgeois S, Carvajal L, et al.** Admixture dynamics in Hispanics: A shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:7234-9. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0508716103>
15. **Rojas W, Parra MV, Campo O, Caro MA, Lopera JG, Arias W, et al.** Genetic make up and structure of Colombian populations by means of uniparental and biparental DNA markers. *Am J Phys Anthropol*. 2010;143:13-20. <http://dx.doi.org/10.1002/ajpa.21270>
16. **Jiang D, Mummidi S, Ahuja SK, Jarrett HW.** CCR5 promoter haplotype transcription complex characterization. *J Health Care Poor Underserved*. 2011;22(Suppl.):73-90. <http://dx.doi.org/10.1353/hpu.2011.0169>
17. **Mummidi S, Bamshad M, Ahuja SS, González E, Feuillet PM, Begum K, et al.** Evolution of human and non-human primate CC chemokine receptor 5 gene and mRNA. Potential roles for haplotype and mRNA diversity, differential haplotype-specific transcriptional activity, and altered transcription factor binding to polymorphic nucleotides. *J Biol Chem*. 2000;275:18946-61. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M000169200>
18. **Liu H, Nakayama EE, Theodorou I, Nagai Y, Likanonsakul S, Wasi C, et al.** Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan. *Int J Immunogenet*. 2007;34:325-35. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-313X.2007.00694.x>
19. **Tang J, Shelton B, Makhatadze NJ, Zhang Y, Schaen M, Louie LG, et al.** Distribution of chemokine receptor CCR2 and CCR5 genotypes and their relative contribution to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion, early HIV-1 RNA concentration in plasma, and later disease progression. *J Virol*. 2002;76:662-72. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.2.662-672.2002>
20. **Kawamura T, Gulden FO, Sugaya M, McNamara DT, Borris DL, Lederman MM, et al.** R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8401-6. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1432450100>
21. **Gong Z, Tang J, Xiang T, Zhang L, Liao Q, Liu W, et al.** Association between regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted (RANTES) -28C/G polymorphism and susceptibility to HIV-1 infection: A meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8:e60683. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0060683>
22. **He J, Li X, Tang J, Jin T, Liao Q, Hu G.** Association between chemotactic chemokine ligand 5 -403G/A polymorphism and risk of human immunodeficiency virus-1 infection: A meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2015;8:727-34. <http://dx.doi.org/10.2147/OTT.S78581>
23. **Ward LD, Kellis M.** Interpreting noncoding genetic variation in complex traits and human disease. *Nat Biotechnol*. 2012;30:1095-106. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2422>

REVISIÓN DE TEMA

## ***Triatoma dimidiata* en Colombia; distribución, ecología e importancia epidemiológica**

Óscar Quirós-Gómez<sup>1,2</sup>, Nicolás Jaramillo<sup>3</sup>, Víctor M. Angulo<sup>1,4</sup>, Gabriel Parra-Henao<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Red Chagas, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Epidemiología y Bioestadística, Universidad CES, Medellín, Colombia

<sup>3</sup> Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>4</sup> Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, CINTROP, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

<sup>5</sup> Centro de Investigación en Salud para el Trópico, Universidad Cooperativa de Colombia, Santa Marta, Colombia

*Triatoma dimidiata* es un importante vector de la enfermedad de Chagas en Centroamérica y en los países del norte de Suramérica. En Colombia, tiene una amplia distribución y su presencia se ha reportado en 14 departamentos de las regiones Andina, Caribe, de los Llanos Orientales y del Alto Magdalena, en las cuales ocupa diferentes ecótopos naturales y artificiales.

La especie está clasificada como secundaria para la transmisión de *Trypanosoma cruzi*; sin embargo, su presencia en el ambiente silvestre, peridoméstico y doméstico en la región Andina, y su capacidad de movilizarse entre ellos, le han permitido escapar al control basado en la aspersion con piretroides y ello resalta su importancia en el mantenimiento de la transmisión del parásito debido a la potencial reinfestación de las viviendas.

La comprensión de las relaciones de *T. dimidiata* con su hábitat, así como el empoderamiento de la comunidad, contribuyen al desarrollo de sistemas de control efectivos y perdurables.

El propósito de esta revisión fue describir la distribución, los factores de riesgo, la ecología, las características entomológicas y los hábitats de las poblaciones de *T. dimidiata* en Colombia, y proponer alternativas de intervención acordes con las características particulares de esta especie.

**Palabras clave:** *Triatoma*; *Trypanosoma cruzi*; enfermedad de Chagas; epidemiología; ecología.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.2893>

### ***Triatoma dimidiata* in Colombia: Distribution, ecology and epidemiological importance**

*Triatoma dimidiata* is an important vector of Chagas disease in Central America and countries of northern South America. In Colombia, it has a wide geographical distribution with reported presence in 14 departments in the Andean, Caribbean, Eastern plains and Upper Magdalena regions, where it occupies different natural and artificial ecotopes.

The species is considered a secondary vector in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. Its presence in wild, peridomestic and intradomestic habitats in the Andean region, coupled with its ability to move between them, has allowed it to escape the control based on pyrethroids spraying, highlighting its importance in maintaining transmission of the parasite through the potential reinfestation of homes.

Understanding the relation of *T. dimidiata* and its habitats, as well as the empowerment of communities, will contribute to the development of effective and lasting control systems.

The purpose of this review was to describe the distribution, risk factors, ecology, entomological features and habitats of *T. dimidiata* populations in Colombia, and to propose alternative interventions in agreement with the specific characteristics of the species.

**Key words:** *Triatoma*; *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; epidemiology; ecology.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.2893>

En esta revisión se resume la información conocida hasta la fecha sobre la distribución, ecología e importancia epidemiológica de *Triatoma dimidiata*, vector de la enfermedad de Chagas en Colombia.

La enfermedad de Chagas es la tercera enfermedad parasitaria más común a nivel global después de la malaria y la esquistosomiasis, y se considera un importante problema de salud pública en

#### **Contribución de los autores:**

Óscar Quirós-Gómez: concepción y diseño del estudio, recolección y resumen de información bibliográfica y escritura del manuscrito

Nicolás Jaramillo: recolección de información bibliográfica y escritura del manuscrito

Víctor M. Angulo: análisis e interpretación de datos

Gabriel Parra-Henao: concepción y diseño del estudio, análisis e interpretación de datos y escritura del manuscrito

Todos los autores participaron en la revisión del manuscrito.

Latinoamérica (1,2). A pesar de ser catalogada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas, principalmente por su asociación con la pobreza, no se la considera una prioridad en los programas de salud pública (3). Dicha desatención puede verse exacerbada por el impacto de enfermedades emergentes como la infección por el virus del zika, la cual recientemente ha llegado a las grandes concentraciones urbanas y, además de sus síntomas en la fase aguda, se ha asociado con el síndrome de Guillain-Barré (4,5) y con microcefalia en recién nacidos (6). Tales efectos la han situado bajo el foco de máxima atención de la población y de los medios de comunicación, lo cual podría ir en detrimento de los programas de vigilancia y control de la enfermedad de Chagas, a pesar del profundo efecto que esta tiene en las comunidades rurales más desfavorecidas del país.

La más reciente estimación de la magnitud de la enfermedad se resume en los indicadores de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) para el año 2010: el número de infectados en el país para la fecha era de 437.960, la tasa de prevalencia era de 0,96 %, con cerca de 4'813.543 personas en riesgo de adquirir la infección (3). Las vías de transmisión son diversas: la congénita, la oral, la transfusión de hemocomponentes contaminados con el parásito y, menos frecuente, el accidente laboral. Sin embargo, la transmisión vectorial es la de mayor magnitud y más difícil control, con una incidencia anual de 5.274 casos (3).

Colombia tiene una rica fauna de triatominos, con presencia de 26 de las 144 especies conocidas, de las cuales 15 se han hallado con infección natural por *Trypanosoma cruzi*. De *Rhodnius prolixus*, la principal especie vectora debido a su eficiencia en la transmisión del parásito, se han detectado poblaciones introducidas en la región Andina, y autóctonas en la región de la Orinoquia (7). *Triatoma dimidiata* Latreille, 1811 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) es considerada la segunda especie vectora dada su frecuencia en las viviendas humanas, la tasa de infección natural con *T. cruzi* y su amplia dispersión en la geografía colombiana. *T. dimidiata* se halla en gran diversidad de ecótopos, con reporte de diferencias intraespecíficas que sugieren la

presencia de varias poblaciones y acentuados contrastes en su relación con los hábitats humanos, por lo cual su perfil epidemiológico tiene alcance diferencial (8,9).

En algunos reportes sobre el riesgo epidemiológico en el país se ha recomendado ahondar en la comprensión del proceso de domiciliación de *T. dimidiata*, ya que tiene presencia en zonas selváticas y, además, invade las viviendas humanas. El estudio de su ecología y comportamiento en el ambiente natural permitiría el desarrollo de nuevas estrategias de vigilancia (10). Reyes, *et al.* (2007), Farfan, *et al.* (2011), y Parra-Henao, *et al.*, han resaltado la importancia de realizar estudios más amplios de las características particulares de *T. dimidiata*, principalmente de la población presente en los departamentos de Boyacá y Santander, debido a que la fumigación con piretroides ha resultado poco efectiva por su movilidad entre el área silvestre, el peridomicilio y el domicilio, así como por su gran capacidad de invadir las viviendas y la baja sensibilidad demostrada en ensayos de laboratorio (11,12).

## Distribución

### América Latina

*Triatoma dimidiata* se encuentra distribuida en una amplia región del continente americano que va desde México hasta el norte de Perú (13). En este amplio territorio se la puede encontrar en hábitats silvestres, en el peridomicilio y en el domicilio, y ha habido reportes de su presencia en el área urbana en diferentes países de América Central, así como en Colombia y en Ecuador (14-17). Con frecuencia se reportan poblaciones en los tres hábitats en una misma área geográfica, en tanto que en Belice, por ejemplo, solo se la ha encontrado en condición silvestre y, ocasionalmente, en el peridomicilio (18).

Las poblaciones domésticas raramente son numerosas; no obstante, la especie se considera el vector más importante de la enfermedad de Chagas en Costa Rica, Ecuador, Guatemala, El Salvador y Nicaragua, y un importante vector secundario en Colombia y Honduras (19). En Ecuador y en el norte de Perú, *T. dimidiata* probablemente fue introducida por vía marítima en la época precolombina y se encuentra exclusivamente en el domicilio y el peridomicilio (20).

La información genética y morfológica sugiere que *T. dimidiata* pudo originarse en la península de Yucatán y, desde allí, dispersarse hacia el sur y el norte del continente, diferenciándose en

#### Correspondencia:

Gabriel Parra-Henao, Carretera Troncal del Caribe, Km 3 Sector Mamatoco, Santa Marta, Colombia  
Teléfono: (575) 420 9604, extensión 5538  
gparrahenao@gmail.com

Recibido: 03/07/16; aceptado: 19/07/16

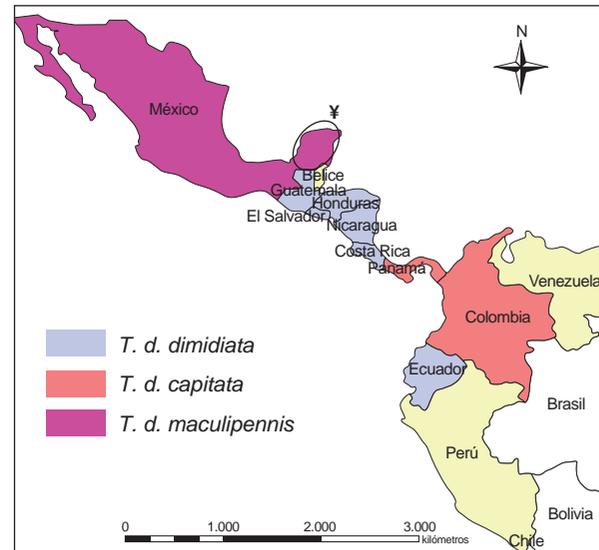
poblaciones relativamente discretas (20,21). Se ha sugerido que en la base de la península de Yucatán se ubicó un centro de dispersión que dio origen a dos linajes evolutivos principales: uno restringido a la península, incluido Belice y el norte de Guatemala, en el cual se originó *T. spp. affinis dimidiata*, y el otro que se dispersó a través de Centroamérica hasta Colombia, y hacia el norte hasta el centro de México y la isla de Cozumel donde se halla la forma insular *T. d. hegneri*. Este linaje dio origen a las tres subespecies continentales del complejo: *T. d. maculipennis* en México, *T. d. dimidiata* desde Centroamérica hasta Costa Rica (y Ecuador, a donde llegó por dispersión pasiva) y *T. d. capitata* desde Panamá hasta Colombia (22). Asimismo, recientemente se ha conocido que en la península de Yucatán existe una amplia zona de hibridación natural de *T. affinis dimidiata* y *T. d. maculipennis*, lo cual confirma la estrecha relación filogenética entre estos dos taxones (23) (figura 1).

### ***Triatoma dimidiata* en Colombia**

La especie fue reportada en el país por Usinger, *et al.*, 1941 (24), Otálora, 1952 (25), Uchrós, *et al.*, 1960 (26), Marinkelle, 1969 (27), D'Alessandro, *et al.*, 1981 (28), Zeledón, *et al.*, 1981 (29), Corredor, *et al.*, 1990 (30), Restrepo, *et al.*, 2002 (31), Guhl, *et al.*, 2007 (7), y Parra-Henao, *et al.*, 2010 (32) y 2015 (33). Se distribuye desde La Guajira hasta Huila, cubriendo 14 departamentos, incluidas las islas de San Andrés y Providencia en el mar Caribe.

*Triatoma dimidiata* presenta un amplio rango altitudinal: en la región Caribe, en el Urabá antioqueño, en el departamento de Magdalena y en La Guajira, entre los 10 y los 40 metros sobre nivel del mar (msnm); en los municipios de las llanuras del departamento del Cesar, entre los 40 y los 175 msnm; en los municipios de los departamentos del Huila, Meta y Boyacá en las estribaciones de la Cordillera Oriental, y en los Llanos Orientales, en altitudes desde los 412 hasta los 488 msnm; en los valles interandinos de Boyacá y Santander alcanza los 620 a 650 msnm; en el costado oriental de la Cordillera Oriental, en los municipios de Casanare, alcanza altitudes que van desde los 1.350 a los 1.525 msnm, y, por último, en algunos municipios de Boyacá y Santander, sobre la Cordillera Oriental, se la encuentra desde los 1.500 hasta los 2.400 msnm (34).

Las poblaciones de la región occidental del país parecen no poseer capacidad de colonización, pues no presentan ningún grado de domiciliación, ya que los pocos individuos reportados en



**Figura 1.** Distribución de *Triatoma dimidiata* en América Latina.  $\$$  Zona de hibridación entre *T. d. maculipennis* y *T. sp. affinis dimidiata*

viviendas han sido adultos, al parecer, atraídos por la luz artificial (Parra-Henao G, Angulo V, Jaramillo N, Restrepo M. Factores de riesgo de infestación domiciliar por *Triatoma dimidiata*. Biomédica. 2009;29(supl.1):316. Memorias, XIV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical y X Simposio PECET). En Antioquia, se ha reportado la presencia de algunos ejemplares adultos en domicilios y peridomicilios en cuatro municipios de la zona de Urabá (Apartadó, Chigorodó, Necoclí y Turbo) (31). Al parecer, dichos insectos eran de origen silvestre y llegaron a estos hábitats de manera accidental, sin que se establecieran en las casas, por lo que su presencia correspondía a intrusiones desde el hábitat selvático sin que se diera la colonización. En los departamentos de Magdalena, Bolívar y Sucre (incluida la Sierra Nevada de Santa Marta), se ha podido determinar que el hábitat de esta especie es silvestre y se ha asociado principalmente a las palmas de la especie *Attalea butyracea*, aunque se han constatado algunas intrusiones en las viviendas (35). Debido a esta característica, el involucramiento vectorial de *T. dimidiata* en la región occidental es poco, con hábitos estrictamente silvestres asociados con las palmas (36).

Por el contrario, se ha reportado que las poblaciones de la región centro-oriental habitan en el domicilio y el peridomicilio, particularmente en los departamentos de Boyacá y Santander (7), incluso, en viviendas en buenas condiciones de construcción

ubicadas en las cabeceras municipales (37). En esta región se han evidenciado focos silvestres desde los cuales se dan intrusiones y colonización de las viviendas. En algunos estudios de campo en el municipio de Boavita, se ha registrado la presencia de poblaciones silvestres de *T. dimidiata* en cuevas, las cuales constantemente incursionan en los ambientes domésticos y peridomésticos (38), dinámica que ha exigido una estricta vigilancia entomológica posterior al tratamiento con insecticidas en esos dos departamentos, en donde se han observado ninfas y adultos de *T. dimidiata* en las viviendas y en las estructuras peridomiciliarias a pesar del control químico, probablemente debido a dichas intrusiones (39,40).

Esta capacidad de movilización también se ha constatado en los estudios genéticos; al analizar la subunidad 4 (ND4) de la NADH deshidrogenasa, Grisales, *et al.*, detectaron diferenciación genética (Hd: 0,863) y estructuración entre poblaciones de *T. dimidiata* ( $\phi_{ST}$ : 0,761) de los departamentos de La Guajira y Cesar (región Caribe) y Santander (región Andina), lo cual sugiere que la gran variabilidad genética de la población en Santander podría estar asociada con las diferencias ecológicas observadas en ese departamento, en donde los individuos silvestres y peridomiciliarios tienden a la domiciliación. Por el contrario, la baja variabilidad genética de la población de *T. dimidiata* en La Guajira podría relacionarse con el estricto hábitat arbóreo que ocupa en la región (41).

Mediante análisis moleculares de la citocromo oxidasa I (COI) y de *multilocus* de microsatélites (*Multilocus Microsatellite Analysis*, MMA) en ejemplares de *T. dimidiata* de una región más amplia de Colombia (seis departamentos de las regiones Caribe y Andina: Santander, Boyacá, Norte de Santander, Bolívar, Cesar y Magdalena), Gómez-Palacio, *et al.*, evidenciaron la presencia de tres grupos de genes correspondientes a tres regiones biogeográficas del país: llanuras del Caribe, Sierra Nevada de Santa Marta y valles interandinos. Además, se encontró un grupo que se diferenciaba de estas tres ecorregiones, lo cual sugería un posible flujo de genes entre las regiones, o la presencia de haplotipos de un origen antiguo (42).

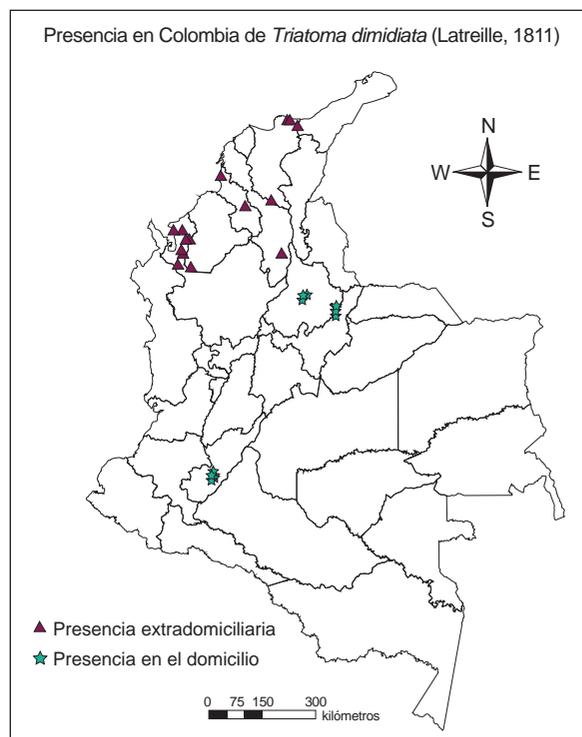
Estos hallazgos, así como el conocimiento actual sobre los hábitats naturales y artificiales y el proceso de dispersión de esta especie, permiten sugerir que en Colombia existen dos poblaciones: una que habita fundamentalmente en palmas, con pocos eventos de colonización en las viviendas,

es decir, de bajo riesgo epidemiológico, en el occidente, y la otra, que se encuentra en cuevas y formaciones rocosas y que, al parecer, es la fuente de las poblaciones domiciliarias implicadas en la transmisión de *T. cruzi* en el centro-oriental del país (valles interandinos) (figura 2).

En el cuadro 1 se resume la información existente sobre la ubicación geográfica de *T. dimidiata*, su ecología, domesticidad e infección con *T. cruzi*, así como su seroprevalencia en humanos en las zonas de estudio.

### Estatus taxonómico

Antes se hizo referencia al posible origen de *T. dimidiata* y su dispersión desde la península de Yucatán, lo cual dio origen a variaciones morfológicas clasificadas como subespecies por Usinger en 1944, a partir de sus trabajos sobre las diferencias en las proporciones de la cabeza, los ojos y la forma de los húmeros (*T. d. capitata*, *T. d. maculipennis* y *T. d. dimidiata*) (24). En 1979, Lent, *et al.*, eliminaron las categorías de subespecies e interpretaron estas variantes con base en un efecto clonal y propusieron la división del género *Triatoma* en dos grupos principales: el grupo Protracta y el



**Figura 2.** Distribución geográfica de las dos poblaciones de *Triatoma dimidiata* en Colombia: presencia extradomiciliaria (silvestre) en el occidente, y en el domicilio en la zona centro-oriental

**Cuadro 1.** Matriz de resumen de los datos sobre aspectos entomológicos, epidemiológicos, ecológicos y de distribución de *Triatoma dimidiata* en Colombia

Departamento	Número de municipios	Número de veredas	Zonas de vida (Holdridge)	Colonización de viviendas	Presencia de <i>T. cruzi</i>	Seroprevalencia en humanos (%)
Antioquia	4	4	BHT, BMHT	No	Sí	2,1
Arauca	1	1	BST	No	No	2,9
Boyacá	21	91	BMHPM, BST, BHMB, BMHMB, BHT	Sí	Sí	5,6
Casanare	2	2	BSMB	Sí	Sí	7,84
Cesar	10	19	BST, BHT	Sí	No	--
Cundinamarca	1		BHMB	Sí	Sí	5
La Guajira	1	1	BST	No	No	--
Huila	1		BST	No	No	--
Magdalena	4	8	BST, BHT	No	Sí	0,32
Meta	2		BMHT	Sí	No	1,78
Norte de Santander	2	1	BHPM, BHT	Sí	Sí	2,6
Santander	29	72	BMHMB, BHT, BMHT, BSMB	Sí	Sí	1,74
San Andrés	1	1	BST	No	No	--
Sucre	1		BST	No	Sí	0,032

BHT: bosque húmedo tropical; BMHT: bosque muy húmedo tropical; BST: bosque seco tropical; BSMB: bosque seco montano bajo; BMHPM: bosque muy húmedo premontano; BHMB: bosque húmedo montano bajo; BHPM: bosque húmedo premontano; BMHMB: bosque muy húmedo montano bajo

grupo *Rubrofasciata* (43). En el 2002, Dujardin, *et al.*, modificaron la clasificación inicial del género e incluyeron nueve complejos y seis subcomplejos correspondientes a áreas geográficas diferentes (44) (cuadro 2).

#### Caracterización genotípica y fenotípica

En los estudios moleculares se han diseñado marcadores para tipificar y caracterizar la dinámica poblacional de *T. dimidiata*. En el 2002, Anderson, *et al.*, describieron ocho *loci* polimorfos de secuencias cortas repetidas (microsatélites) para la especie (45). Asimismo, se han hecho análisis con otros marcadores nucleares mediante amplificación aleatoria de ADN polimorfo (*Random Amplification of Polymorphic DNA*, RAPD) (38,46), y marcadores mitocondriales como una fracción del gen de la subunidad 16s -mtlsurRNA y del citocromo b -mtCytB (47).

Quizá uno de los marcadores más informativos hasta ahora para la descripción de la estructura poblacional de esta especie es el segundo espaciador intergénico ribosómico nuclear (*Internal Transcribed Spacer*, ITS-2). Este marcador ha permitido establecer importantes variaciones puntuales en nucleótidos y en el número de secuencias cortas repetidas (microsatélites) entre diferentes poblaciones de México, Honduras, Nicaragua y Ecuador (20,48). Al comparar la parsimonia y las secuencias del ITS-2 de varias especies de las tribus Triatomini y Rhodniini, Marcilla, *et al.*, observaron muy poca variación entre las especies pertenecientes al complejo *Phyllosoma*, con ausencia

total de diferencias en los nucleótidos, a excepción de *T. dimidiata*, que presenta un nucleótido diferente (20). Por lo tanto, se considera que el grupo de especies del complejo es monofilético, lo cual sugiere un ancestro común. Estos trabajos han revelado una compleja estructura poblacional de *T. dimidiata* relacionada con aspectos epidemiológicos importantes, como la capacidad de realizar con éxito un eventual proceso de transición de hábitats, altas tasas de infección natural y áreas biogeográficas con mayor riesgo potencial (21,38).

Por su parte, Panzera, *et al.*, reportaron variaciones en el tamaño del genoma y diferencias en el citotipo de poblaciones de México, Guatemala, El Salvador y Colombia. Se encontraron tres citotipos, de los cuales el número 1 se halló en las poblaciones de los cuatro países asociado con ambientes domésticos, peridomésticos y selváticos, en tanto que los citotipos 2 y 3 se asociaron a poblaciones selváticas, lo cual sugiere que se trata de especies crípticas correspondientes a los tres citotipos con diferente riesgo epidemiológico para la enfermedad de Chagas (21). Por el contrario, mediante análisis del ITS-2 y su correspondencia filogenética, Barges, *et al.*, sugirieron reasignar el estatus subespecífico de algunos grupos biogeográficos, aunque no había información suficiente que sustentara la elevación del rango a nivel específico; en ese marco, *T. dimidiata capitata* fue la única subespecie asignada para el país (22). Según el estudio de estos autores, se reubicaron las subespecies identificadas y, además, se describió una

**Cuadro 2.** *Triatoma dimidiata* según la clasificación propuesta por Dujardin, *et al.*, 2002

Grupo Proctata	Grupo Rubrofasciata
<b>Complejo Lenticularia</b> <i>indictiva, lecticularia, sanguisuga</i>	<b>Subgrupo Infestans</b> Tres complejos, seis subcomplejos, 34 especies
<b>Complejo Proctacta</b> <i>barberi, incrassata, neotomae, nitida, peninsularis, proctacta, sinaloensis</i>	<b>Subgrupo Rubrofasciata</b> Cuatro complejos, 27 especies <i>Triatoma dimidiata</i> hace parte del complejo Phyllosoma

nueva especie, *T. spp. affinis dimidiata*, y se integró una especie insular, la *T. hegneri*, al complejo con el nuevo nombre de *T. d. hegneri*. En conclusión, el estado taxonómico actual de *T. dimidiata* reconoce dos especies: *T. spp. affinis dimidiata* y *T. dimidiata*, y cuatro subespecies: *T. d. hegneri*, *T. d. dimidiata*, *T. d. maculipennis* y *T. d. capitata*, lo cual permite su reconocimiento como complejo (49).

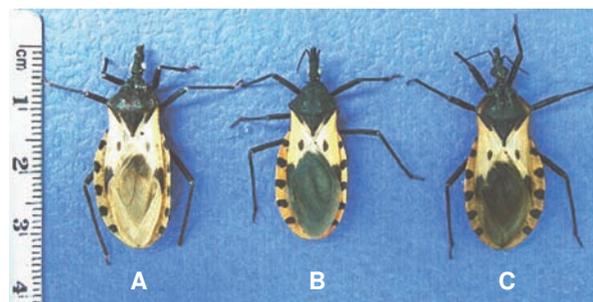
Zeledón, *et al.*, Jurberg, *et al.*, y Schofield han considerado que *T. dimidiata* es un ensamblaje de poblaciones morfológicas de gran variedad y han planteado la existencia de un complejo de especies con base en las variaciones de tamaño y coloración (29,50,51). No obstante, en términos generales, se trata de una especie con individuos de tamaño grande y colorido distintivo en el cuerpo: de píceo a negro en el conexivo y de amarillo pálido a amarillo naranja en el *corium* (*hemelytron*). El macho mide entre 24,5 y 32 mm y, la hembra, entre 24,5 y 35 mm (43,50) (figura 3). La variación morfológica entre las poblaciones de triatomos podría estar asociada con la ecogeografía, la preferencia de huésped y el hábitat (52-54). En el caso de *T. dimidiata*, en algunos estudios se ha logrado discriminar y correlacionar las poblaciones con su procedencia geográfica, lo que, al parecer, es una de las principales causas de las divergencias evolutivas (55,56).

En estudios comparativos de los patrones sensoriales de las antenas de *T. dimidiata* en Colombia, se han señalado variaciones en la densidad de las sensillas asociadas con el hábitat (57); igualmente, se ha observado variación cromática en especímenes recolectados en diferentes regiones del país (Parra-Henao, observación personal). En su estudio sobre cuatro poblaciones de *T. dimidiata* en Colombia, Esteban-Adarme hizo la descripción morfológica de caracteres métricos de la cabeza, la morfología de la genitales externos y los patrones de coloración, y halló que las poblaciones del occidente (departamentos de Cesar y Magdalena) presentaban mayores tamaños de la cabeza, los ojos y el ocelo que las demás poblaciones estudiadas, así como un mayor número de dentículos del

proceso del endosoma; describió, asimismo, un patrón de coloración uniformemente negro en el pronoto, característico de las poblaciones en el oriente (departamentos de Boyacá y Santander), en tanto que en el occidente encontró que el lóbulo posterior era negro con líneas laterales amarillas y anaranjadas. Las características descritas en dicho estudio sugerían la existencia de dos grupos morfológicos distinguibles, cuya diferenciación podría deberse a factores geográficos o ecológicos (53).

### Comportamiento y alimentación

*Triatoma dimidiata* presenta un comportamiento ecléctico, con un amplio espectro de huéspedes, los cuales incluyen desde especies silvestres y domésticas hasta el hombre. La sangre humana es la más comúnmente hallada en los insectos recolectados en el domicilio y peridomicilio (34). La especie ocupa ecótopos tanto naturales como artificiales, con éxito parcial o completo. Si las condiciones del refugio lo permiten, los perros y las gallinas son sus huéspedes más frecuentes, aunque un factor importante en la visita de los adultos silvestres a los domicilios humanos es la atracción hacia la luz artificial (58). El hallazgo de sangre de reservorios silvestres en el contenido estomacal de *T. dimidiata*, asociado con las altas tasas de infección natural, indicaría que participa de manera activa en el transporte de *T.*



**Figura 3.** Variación cromática en especímenes de *Triatoma dimidiata* procedentes de diferentes regiones de Colombia. **A.** Huila. **B.** Boyacá. **C.** Sierra Nevada de Santa Marta. Fotografía: Gabriel Parra-Henao

*cruzi* hacia el ambiente doméstico, y que es una fuente importante de infestación y reinfestación de construcciones humanas (59-61).

La capacidad de *T. dimidiata* para reinfestar las viviendas ha llevado a estudiar esta característica después de la aspersión química; en este sentido, Dumontiel, *et al.*, hicieron un estudio piloto en Yucatán para evaluar la infestación antes y después de la aspersión con ciflutrina (Solfac®, Bayer) en el domicilio, el peridomicilio y los hábitats selváticos. Durante el estudio, se encontraron especímenes vivos en el domicilio en los primeros cuatro meses después de la aspersión. Los vectores empezaron a visitar los domicilios a partir de marzo y hasta finales de junio. Se determinó que, en los domicilios, predominaron los especímenes adultos, en tanto que los estadios de ninfa se recolectaron en el peridomicilio y en hábitats selváticos, lo cual sugiere que los adultos migraron de sitios cercanos y que su presencia no se debía a su supervivencia a la aspersión (62).

Torres-Montero, *et al.*, determinaron la infestación y las fuentes de alimentación de *T. dimidiata* en viviendas ubicadas en el centro del estado de Veracruz, México. Mediante amplificación del gen mitocondrial citocromo b, se identificó la presencia de sangre humana en el 87,5 % de los triatominos del domicilio, seguida de sangre de ratón en 25 % y de rata en 20 % y, en menor medida, de sangre de gallina, gato y perro. Por el contrario, en los individuos capturados en el peridomicilio, predominó la sangre de rata (50 %), seguida de la de humano (25 %). Se encontró una triple infección por sangre humana, de gallina y de caballo, lo cual corrobora la movilidad de *T. dimidiata* entre el domicilio y el peridomicilio (63).

En Colombia, Farfán-García, *et al.*, mediante ELISA, detectaron proteínas sanguíneas en el contenido intestinal de individuos de *T. dimidiata* capturados en el domicilio y fuera de él en los municipios de Capitanejo y Macaravita en el departamento de Santander. En general, la sangre de animales domésticos fue la más frecuente (40,6 %), seguida de la sangre de huéspedes silvestres y humanos (4,6 % y 4,7 %, respectivamente). En 43,1 % de los individuos capturados en el domicilio se encontró sangre de gallina, sangre humana en 31,4 % de ellos, de perro en 17,6 % y de caprino en 15,7 %. En los especímenes provenientes del peridomicilio y del hábitat silvestre, no se detectó sangre humana, siendo los animales domésticos y el armadillo las fuentes de preferencia. Es importante destacar el

hallazgo de sangre de animales silvestres, como la zarigüeya y el armadillo, en 7,8 % de los insectos capturados en las viviendas, al igual que sangre de animales domésticos en los especímenes del hábitat silvestre, lo cual evidencia, una vez más, la movilidad de *T. dimidiata* (12).

En condiciones experimentales, se ha evaluado el tiempo de alimentación en conejos y de defecación de colonias de *T. dimidiata* mantenidas en condiciones de humedad relativa de  $65 \pm 10$  % y de temperatura de  $27,3 \pm 3$  °C. No se observaron diferencias en el tiempo de alimentación y el transcurrido hasta la defecación en los estadios de ninfa. El primer estadio de ninfa fue el que más tiempo empleó en su alimentación ( $25 \pm 2$  minutos) y el cuarto estadio el que menos tiempo empleó ( $15 \pm$  minutos). Un comportamiento igual se determinó en cuanto al tiempo transcurrido entre la alimentación y la defecación ( $45 \pm 6$  minutos Vs.  $21 \pm 8$  minutos, respectivamente). Hembras y machos necesitaron el mismo tiempo para alimentarse ( $15 \pm 5$  minutos Vs.  $14 \pm 5$  minutos), y también fue el mismo el transcurrido hasta la defecación ( $20 \pm 6$  minutos Vs.  $21 \pm 7$  minutos) (64).

### Factores asociados con la presencia de triatominos en viviendas humanas

La enfermedad de Chagas ocurre en contextos caracterizados por determinados factores socio-culturales, políticos, económicos, ambientales e históricos directamente relacionados con la dispersión de los triatominos (65). Las condiciones socio-económicas son determinantes para la infestación domiciliar y, en algunos estudios, se ha reportado que la probabilidad de encontrar individuos de *T. dimidiata* es 4,3 a 10 veces mayor en viviendas con condiciones socioeconómicas deficientes que en aquellas con buenas condiciones (17).

Algunas de las características de la vivienda asociadas con la presencia de *T. dimidiata* incluyen las paredes no revocadas o de revocado incompleto (*odds ratio*, OR=3,9; IC<sub>95%</sub> 1,9-7,7), las paredes de bahareque (OR=4,8; IC<sub>95%</sub> 1,4-17,1) (8,66), las paredes de adobe comparadas con las de bloque (OR=9,55; IC<sub>95%</sub> 2,1-44,5) (17), el piso de tierra (OR=10,1; IC<sub>95%</sub> 5,3-18,04), tener tres o más habitaciones (OR=2,04; IC<sub>95%</sub> 1,1-3,9), los techos de lámina de cartón (OR=6,8; IC<sub>95%</sub> 1,5-31,3) (67), los techos mixtos (teja y palma) (OR=36,1; IC<sub>95%</sub> 12,2-106,9), la presencia de gatos (OR=3,94; IC<sub>95%</sub> 1,4-11), y la acumulación de rocas (OR=5,3; IC<sub>95%</sub> 1,6-17) (8). También, se ha reportado como factor asociado con la infestación la localización

de la casa cerca de la periferia de la localidad, la presencia de gallineros y de dos o más perros (8,67). No obstante, Zeledón, *et al.*, reportaron la colonización por especímenes silvestres de *T. dimidiata* de un ecótopo artificial en el patio trasero de una casa nueva, bien construida, en Santa Ana, provincia de San José, en Costa Rica (61).

Otro de los factores asociados con la infestación domiciliar ha sido la luz artificial. Pacheco-Tucuch, *et al.*, realizaron un estudio en las villas rurales de Bokoba, Teya y Sudzal, en la parte central del estado de Yucatán, México, en el cual evaluaron la relación entre la infestación de las casas y las fuentes de luz, y la compararon con la distancia entre la casa y dichas fuentes. El análisis cuantitativo mostró una relación inconsistente entre las luces de la parte externa de las viviendas y las viviendas infestadas; solo en villa Boboka se encontró una relación significativa ( $p=0,028$ , OR; IC<sub>95%</sub> 1,2-2,2). Los autores encontraron, en cambio, una asociación estadística entre las viviendas infestadas y las luces públicas ( $p=0,008$ ). Las casas infestadas estaban a  $18 \pm 0,6$  m de la luz pública y, las no infestadas, a  $22,6 \pm 0,4$  m ( $p<0,001$ ). Un análisis experimental adicional evidenció que tanto machos como hembras adultas de *T. dimidiata* se vieron fuertemente atraídos a túneles con luz blanca ( $p<0,001$ ) (58).

Las condiciones climáticas también inciden en el número de insectos capturados durante el año, el cual aumenta en las temporadas secas, que en Centroamérica corresponden a los meses de marzo y septiembre (68,69). En algunos estudios, se ha examinado la relación entre las variables climáticas y la presencia de *T. dimidiata* utilizando sistemas de información geográfica y los parámetros registrados en las estaciones. Bustamante, *et al.*, por ejemplo, encontraron que la temperatura absoluta máxima, es decir, la temperatura más alta registrada en un año, se asoció significativamente con la presencia de *T. dimidiata* (70) y, mediante modelos de nicho ecológico, Parra-Henao, *et al.*, encontraron una asociación con el índice de vegetación, la temperatura estacional y la precipitación anual en poblaciones recolectadas en las regiones centro-oriental y noroccidental del país (71).

La distribución y el número de especímenes pueden variar considerablemente ante la presencia de fenómenos naturales, como huracanes o inundaciones. Guzmán-Tapia, *et al.*, estudiaron los cambios en la distribución de *T. dimidiata* después del paso del huracán Isidoro, que afectó la costa

norte del golfo de México. Los autores recolectaron especímenes en enero de 2003, tres meses después del huracán, y hasta diciembre de ese año. El principal hallazgo reportado fue la asociación del paso del huracán con las variaciones a mediano y largo plazo en la infestación domiciliar por *T. dimidiata*. Se observó un aumento en el número de insectos adultos en el trimestre de enero a marzo, comparado con el mismo periodo en años anteriores ( $p=0,04$ ), lo cual sugería que se habían producido nuevas llegadas de insectos (72).

## Conclusiones

El comportamiento ecléctico de *T. dimidiata* en el contexto de una economía y una situación geopolítica inestables y en ausencia de la supresión permanente del vector, plantea un complejo panorama de riesgo epidemiológico, lo cual se suma al incremento de procesos poco comunes en la transmisión de *T. cruzi*, como han sido los recientes brotes de infección por vía oral (73-76). La situación de *T. dimidiata* en Colombia requiere que los investigadores y estudiosos propongan estrategias novedosas para el control de los vectores.

Como alternativa al control con insecticidas, se han modificado las viviendas teniendo en cuenta los factores asociados con la presencia domiciliar de *T. dimidiata*. Dichas modificaciones han incluido el cambio de elementos estructurales de deficiente calidad por materiales suaves y planos que no se conviertan en potenciales refugios de los insectos. Algunas de estas estrategias han sido exitosas y han logrado reducir las tasas de infestación hasta en 96,4 %, en tanto que las intervenciones combinadas de aspersion con insecticidas piretroides y modificaciones en las viviendas han logrado reducciones de hasta 100 % (77).

Las intervenciones integrales se han basado en el concepto de "ecosalud", el cual tiene en cuenta los factores ecológicos y sociales determinantes de la transmisión del parásito, y el trabajo intersectorial y educativo en la comunidad, con el fin de garantizar la sostenibilidad de las intervenciones (78). Este tipo de estrategias concita una gran participación de la comunidad y permite que las medidas perduren, tanto en lo referente a la estructura de las viviendas (79) como al control de animales asociados con la infestación de vectores (80). Por ello, su importancia ha sido reconocida por la OMS, ya que tienen en cuenta las realidades sociales y culturales de las poblaciones afectadas e incorporan de manera integral sus intereses y necesidades en los sistemas de vigilancia y control

(81). En tales estrategias, se ha recurrido a diversas metodologías cualitativas que incluyen entrevistas individuales y grupales, etnografía y observación (65,82).

La Red Chagas Colombia ha venido estudiando los factores socioculturales determinantes y las dinámicas de acceso al diagnóstico y a la atención integral en algunos departamentos del país, con el fin de comprender los significados culturales de la enfermedad para incorporarlos a las estrategias de prevención, control y tratamiento integral (83).

Estas aproximaciones cualitativas y mixtas son de gran utilidad, por lo cual el llamado es a continuar trabajando desde esta perspectiva y con un enfoque más específico en torno a los aspectos culturales del riesgo, de la enfermedad de Chagas, los vectores y el significado de la prevención. Ello podría tener efectos futuros positivos al incentivar una mejor comprensión, apropiación y empoderamiento de las comunidades en torno a la dinámica de la transmisión de la enfermedad por la vía vectorial y, especialmente, a su prevención, así como al mejoramiento de las condiciones habitacionales y la promoción de condiciones saludables en el domicilio y el peridomicilio.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existieron conflictos de intereses con respecto a la concepción, desarrollo y la publicación de este trabajo.

#### Financiación

Red Chagas Colombia, contrato Colciencias 380-2011, código 5014-537-30398, y por la convocatoria 567 de Colciencias para becas de doctorado a nivel nacional.

#### Referencias

1. **Carod-Artal FJ, Gascon J.** Chagas disease and stroke. *Lancet Neurol.* 2010;9:533-42. [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70042-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70042-9)
2. **Pereira Nunes MC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL.** Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of Cardiology. Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62:767-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>
3. **World Health Organization.** Chagas disease in Latin America: An epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec.* 2015;90:33-43.
4. **Araujo LM, Ferreira MLB, Nascimento OJ.** Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2016;74: 253-5. <http://dx.doi.org/10.1590/0004-282X20160035>
5. **Watrín L, Ghawché F, Larre P, Neau J-P, Mathis S, Fournier E.** Guillain-Barré syndrome (42 cases) occurring during a Zika virus outbreak in French Polynesia. *Medicine (Baltimore).* 2016;95:e3257. <http://dx.doi.org/10.1097/MD.0000000000003257>
6. **de Oliveira CS, da Costa Vasconcelos PF.** Microcephaly and Zika virus. *J Pediatr (Rio J).* 2016;92:103-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2016.02.003>
7. **Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D.** Updated geographical distribution and ecoepidemiology of the triatomine fauna (Reduviidae: Triatominae) in Colombia. *Biomédica.* 2007;27(Supl.1):143-62. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.258>
8. **Parra-Henao G, Cardona AS, Quirós-Gómez O, Angulo V, Alexander N.** House-level risk factors for *Triatoma dimidiata* infestation in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92:193-200. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.14-0273>
9. **Gómez-Palacio A, Triana O, Jaramillo-O N, Dotson EM, Marcet PL.** Eco-geographical differentiation among Colombian populations of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae). *Infect Genet Evol J.* 2013;20:352-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.09.003>
10. **Guhl F, Pinto N, Aguilera G.** Sylvatic triatominae: A new challenge in vector control transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(Suppl.1):71-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000900012>
11. **Reyes M, Angulo VM, Sandoval CM.** Efecto tóxico de b-cipermetrina, deltametrina y fenitrotión en cepas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (Hemiptera, Reduviidae). *Biomédica.* 2007;27(Supl.1):75-82. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.250>
12. **Farfán-García AE, Angulo-Silva VM.** *Triatoma dimidiata* populations (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) feeding behaviour in an endemic zone and related epidemiological implications. *Rev Salud Pública.* 2011;13:163-72. <http://dx.doi.org/10.1590/S0124-00642011000100014>
13. **Chaverra-Rodríguez D.** Morfología y taxonomía de triatominos. En: *Fronteras de investigación en enfermedades infecciosas: modelo enfermedad de Chagas.* Primera edición. Medellín: Universidad de Antioquia; 2011. p. 23-44.
14. **Monroy MC, Bustamante DM, Rodas AG, Enríquez ME, Rosales RG.** Habitats, dispersion and invasion of sylvatic *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Petén, Guatemala. *J Med Entomol.* 2003;40:800-6. <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-40.6.800>
15. **Zeledón R, Calvo N, Montenegro VM, Lorosa ES, Arévalo C.** A survey on *Triatoma dimidiata* in an urban area of the province of Heredia, Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100:507-12. <http://dx.doi.org/S0074-02762005000600002>
16. **Guzmán-Tapia Y, Ramírez-Sierra MJ, Dumonteil E.** Urban infestation by *Triatoma dimidiata* in the city of Mérida, Yucatán, México. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007;7:597-606. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2007.0133>
17. **Bustamante DM, Monroy C, Pineda S, Rodas A, Castro X, Ayala V, et al.** Risk factors for intradomestic infestation by the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata* in Jutiapa, Guatemala. *Cad Saúde Pública.* 2009;25(Suppl.1):S83-92. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2009001300008>

18. **World Health Organization.** Control of Chagas disease: Second report of the WHO expert committee. Geneva: World Health Organization; 2002.
19. **Dorn PL, Monroy C, Curtis A.** *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): A review of its diversity across its geographic range and the relationship among populations. *Infect Genet Evol.* 2007;7:343-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2006.10.001>
20. **Marcilla A, Barges MD, Ramsey JM, Magallón-Gastelum E, Salazar-Schettino PM, Abad-Franch F, et al.** The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mol Phylogenet Evol.* 2001;18:136-42. <http://dx.doi.org/10.1006/mpev.2000.0864>
21. **Panzer F, Ferrandis I, Ramsey J, Ordóñez R, Salazar-Schettino PM, Cabrera M, et al.** Chromosomal variation and genome size support existence of cryptic species of *Triatoma dimidiata* with different epidemiological importance as Chagas disease vectors. *Trop Med Int Health.* 2006;1:1092-103. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01656.x>
22. **Barges MD, Klisiowicz DR, González-Candelas F, Ramsey JM, Monroy C, Ponce C, et al.** Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2:e233. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000233>
23. **Herrera-Aguilar M, Be-Barragán LA, Ramírez-Sierra MJ, Tripet F, Dorn P, Dumonteil E.** Identification of a large hybrid zone between sympatric sibling species of *Triatoma dimidiata* in the Yucatán peninsula, México, and its epidemiological importance. *Infect Genet Evol J.* 2009;9:1345-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.09.009>
24. **Usinger RL.** The triatominae of North and Central America and the West Indies and their public health significance. Washington, D.C.: Government Printing Office; 1944.
25. **Otálora B.** *Triatoma dimidiata* (Latreille). *An Soc Biol.* 1952;5:135-7.
26. **Ucrós H, Rocha H, Duque M.** Distribución de Triatominae en Colombia. *Antioquia Médica.* 1971;8:707-17.
27. **Marinkelle C.** The distribution of Colombian Triatominae and their infestation with trypanosomatid flagellates. Geneva: World Health Organization; 1969.
28. **D'Alessandro A, Barreto P, Thomas M.** Nuevos registros de triatominae domiciliarios y extradomiciliarios en Colombia. *Colomb Med.* 1981;12:75-85.
29. **Zeledón R, Rabinovich JE.** Chagas disease: An ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu Rev Entomol.* 1981;26:101-33. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.26.010181.000533>
30. **Corredor A, Santacruz M, Páez S, Guateme L.** Distribución de los triatominae domiciliarios en Colombia. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 1990.
31. **Restrepo M, Restrepo C, Parra G, Salazar C.** Estudios sobre la tripanosomiasis americana en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical. En: Curso Taller Internacional-Sistemas de información geográfica, sensores remotos y genética poblacional de vectores y parásitos aplicados al control de la enfermedad de Chagas. Bogotá: Universidad de los Andes; 2002.
32. **Parra-Henao G, Angulo V, Jaramillo N, Restrepo M.** Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) de la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. Aspectos epidemiológicos, entomológicos y de distribución. *CES Med.* 2010;23:17-26.
33. **Parra-Henao G, Flórez-Martínez M, Angulo Silva V.** Vigilancia de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) en Colombia. Primera edición. Bogotá: Sic Editorial Ltda; 2015. p. 127.
34. **Angulo V.** *Triatoma dimidiata* en Colombia, aspectos biológicos y eco-epidemiológicos. Curso Taller Internacional: el uso de los sistemas de información geográfica y sensores remotos (SR) en salud pública. Bogotá: Universidad de los Andes; 2006.
35. **Parra-Henao G, Restrepo M, Restrepo B, Domínguez J.** Estudio de tripanosomiasis americana en dos poblados indígenas de la Sierra Nevada de Santa Marta. *CES Med.* 2004;18:43-50.
36. **Cantillo-Barraza O, Gómez-Palacio A, Salazar D, Mejía-Jaramillo AM, Calle J, Triana O.** Distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominae (Reduviidae: Triatominae) en la Isla Margarita del departamento de Bolívar, Colombia. *Biomédica.* 2010;30:382-9. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v30i3.272>
37. **Gutiérrez R, Angulo V, Aguilar F, Reyes A, Tarazona Z, Sandoval C.** Aspectos ecológicos de la enfermedad de Chagas en la región nororiental de Colombia. En: Memorias del Curso taller internacional: Biología, epidemiología y control de tripanosomiasis americana y leishmaniosis. Ibagué: Universidad del Tolima; 2000.
38. **Ramírez CJ, Jaramillo CA, del Pilar-Delgado M, Pinto NA, Aguilera G, Guhl F.** Genetic structure of sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from an endemic zone of Boyacá, Colombia. *Acta Trop.* 2005;93:23-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.09.001>
39. **Turriago B.** Evaluación de deltametrina como alternativa de control de *Triatoma dimidiata* y determinación de la prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en perros en una región endémica para la enfermedad de Chagas en el departamento de Boyacá, Colombia (tesis). Bogotá: Universidad de los Andes; 2005.
40. **Angulo V.** Ensayo de estrategias de control y vigilancia de *Triatoma dimidiata* en Colombia. En: Memorias del Primer Taller Internacional sobre control de la enfermedad de Chagas, Bogotá: Universidad de los Andes; 2005. p. 91-105.
41. **Grisales N, Triana O, Angulo V, Jaramillo N, Parra-Henao G, Panzer F, et al.** Diferenciación genética de tres poblaciones colombianas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) mediante análisis molecular del gen mitocondrial ND4. *Biomédica.* 2010;30:207-14. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v30i2.184>
42. **Gómez-Palacio A, Triana O.** Molecular evidence of demographic expansion of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e2734. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002734>
43. **Lent H, Wygodzinsky PW.** Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist.* 1979;163:3.

44. **Dujardin J-P, Schofield J, Panzera F, Matías A, De La Riva J.** Los vectores de la enfermedad de Chagas. Bruxelles: Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer; 2002. Fecha de consulta: 1° de marzo de 2015. Disponible en: <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010055328>
45. **Anderson RP, Gómez-Laverde M, Peterson AT.** Geographical distributions of spiny pocket mice in South America: Insights from predictive models. *Glob Ecol Biogeogr.* 2002;11:131-41. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1466-822X.2002.00275.x>
46. **Calderón CI, Dorn PL, Melgar S, Chávez JJ, Rodas A, Rosales R, et al.** A preliminary assessment of genetic differentiation of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) in Guatemala by random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *J Med Entomol.* 2004;41:882-7. <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.5.882>
47. **Lyman DF, Monteiro FA, Escalante AA, Cordón-Rosales C, Wesson DM, Dujardin JP, et al.** Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60:377-86.
48. **Bargues M, Guhl F, Mas-Coma S.** Genetic characterization of domestic, peridomestic and sylvatic *Triatoma dimidiata* populations from Colombia by ribosomal DNA ITS-2 sequence analyses. *Acta Trop.* 2002;83:149.
49. **Gómez-Palacio A.** Diferenciación poblacional de *Triatoma dimidiata capitata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) de Colombia y su relación con la evolución molecular del complejo críptico dimidiata (tesis). Medellín: Universidad de Antioquia; 2012.
50. **Jurberg J, Galvão C, Noireau F, Carcavallo RU, Rocha D da S, Lent H.** Uma iconografia dos Triatomíneos (Hemiptera:Reduviidae). Rio de Janeiro: Editora Gama Filho; 2005.
51. **Schofield CJ.** Propuestas de estrategias para el control de *Triatoma dimidiata* en Colombia. En: Memorias del Primer Taller Internacional sobre control de la enfermedad de Chagas. Bogotá: Universidad de los Andes; 2005.
52. **Barbosa SE, Dujardin JP, Soares RP, Pires HH, Margonari C, Romanha AJ, et al.** Interpopulation variability among *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) from Brazil. *J Med Entomol.* 2003;40:411-20. <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-40.4.411>
53. **Esteban L.** Variabilidad morfológica entre poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Latreille 1811), procedentes de cuatro departamentos de Colombia (tesis). Medellín: Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín; 2010.
54. **Dujardin JP, Costa J, Bustamante D, Jaramillo N, Catalá S.** Deciphering morphology in Triatominae: The evolutionary signals. *Acta Trop.* 2009;110: 101-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.09.026>
55. **Bustamante DM, Monroy C, Menes M, Rodas A, Salazar-Schettino PM, Rojas G, et al.** Metric variation among geographic populations of the Chagas vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species. *J Med Entomol.* 2004;41:296-301. <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.296>
56. **Catalá S, Sachetto C, Moreno M, Rosales R, Salazar-Schettino PM, Gorla D.** Antennal phenotype of *Triatoma dimidiata* populations and its relationship with species of Phyllosoma and Protracta complexes. *J Med Entomol.* 2005;42:719-25. <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/42.5.719>
57. **Arroyo CM, Esteban L, Catalá S, Angulo VM.** Variación del fenotipo antenal de poblaciones del domicilio, peridomicilio y silvestres de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) en Santander, Colombia. *Biomédica.* 2007;27:92-100. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.252>
58. **Pacheco-Tucuch FS, Ramírez-Sierra MJ, Gourbière S, Dumonteil E.** Public street lights increase house infestation by the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *PLoS One.* 2012;7:e36207. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0036207>
59. **Zeledón R, Solano G, Zúñiga A, Swartzwelder JC.** Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). 3. Habitat and blood sources. *J Med Entomol.* 1973;10:363-70. <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/10.4.363>
60. **Zeledón R, Solano G, Burstin L, Swartzwelder JC.** Epidemiological pattern of Chagas' disease in an endemic area of Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg.* 1975;24:214-25.
61. **Zeledón R, Montenegro VM, Zeledón O.** Evidence of colonization of man-made ecotopes by *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) in Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96:659-60. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762001000500012>
62. **Dumonteil E, Ruiz-Piña H, Rodríguez-Félix E, Barrera-Pérez M, Ramírez-Sierra MJ, Rabinovich JE, et al.** Re-infestation of houses by *Triatoma dimidiata* after intradomicile insecticide application in the Yucatán peninsula, México. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:253-6. <http://dx.doi.org/S0074-02762004000300002>
63. **Torres-Montero J, López-Monteon A, Dumonteil E, Ramos-Ligonio A.** House infestation dynamics and feeding sources of *Triatoma dimidiata* in central Veracruz, México. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86:677-82. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0746>
64. **Martínez-Ibarra JA, Miguel-Álvarez A, Arredondo-Jiménez JI, Rodríguez-López MH.** Update on the biology of *Triatoma dimidiata* Latreille (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *J Am Mosq Control Assoc.* 2001;17:209-10.
65. **Ventura-García L, Roura M, Pell C, Posada E, Gascón J, Aldasoro E, et al.** Socio-cultural aspects of Chagas disease: A systematic review of qualitative research. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2410. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002410>
66. **Dumonteil E, Nouvellet P, Rosecrans K, Ramírez-Sierra MJ, Gamboa-León R, Cruz-Chan V, et al.** Eco-bio-social determinants for house infestation by non-domiciliated *Triatoma dimidiata* in the Yucatán Peninsula, México. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2466. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002466>
67. **Medina-Torres I, Vázquez-Chagoyán JC, Rodríguez-Vivas RI, de Oca-Jiménez RM.** Risk factors associated with triatomines and its infection with *Trypanosoma cruzi* in rural communities from the southern region of the State of México, México. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82:49-54. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.08-0624>
68. **Hernández JL, Rebollar-Téllez EA, Infante F, Morón A, Castillo A.** Indicators of infestation, colonization and infection of *Triatoma dimidiata* (Latreille) (Hemiptera: Reduviidae) in Campeche, México. *Neotrop Entomol.* 2010;39:1024-31. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2010000600027>

69. **Polonio R, Ramírez-Sierra MJ, Dumonteil E.** Dynamics and distribution of house infestation by *Triatoma dimidiata* in central and southern Belize. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009;9:19-24. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2008.0002>
70. **Bustamante DM, Monroy MC, Rodas AG, Juárez JA, Malone JB.** Environmental determinants of the distribution of Chagas disease vectors in south-eastern Guatemala. *Geospat Health.* 2007;1:199-211. <http://dx.doi.org/10.4081/gh.2007.268>
71. **Parra-Henao G, Quirós-Gómez O, Jaramillo-O N, Cardona ÁS.** Environmental determinants of the distribution of Chagas disease vector *Triatoma dimidiata* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94:767-74. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.15-0197>
72. **Guzmán-Tapia Y, Ramírez-Sierra MJ, Escobedo-Ortegón J, Dumonteil E.** Effect of Hurricane Isidore on *Triatoma dimidiata* distribution and Chagas disease transmission risk in the Yucatán Peninsula of México. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73:1019-25.
73. **Ríos JF, Arboleda M, Montoya AN, Alarcón EP.** Probable outbreak of oral transmission of Chagas disease in Turbo, Antioquia. *Biomédica.* 2011;31:185-95. <http://dx.doi.org/10.1590/S0120-41572011000200005>
74. **Ramírez JD, Montilla M, Cucunubá ZM, Flórez AC, Zambrano P, Guhl F.** Molecular epidemiology of human oral Chagas disease outbreaks in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2041. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002041>
75. **Soto H, Tibaduiza T, Montilla M, Triana O, Suárez DC, Torres MT, et al.** Investigation of vectors and reservoirs in an acute Chagas outbreak due to possible oral transmission in Aguachica, Cesar, Colombia. *Cad Saúde Pública.* 2014;30:746-56. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00024013>
76. **Nicholls RS.** Informe de la consulta técnica en epidemiología, prevención y manejo de la transmisión de la enfermedad de Chagas como enfermedad transmitida por alimentos: la experiencia en Colombia. Rio de Janeiro; OPS; 2006.
77. **Rojas de Arias A, Ferro EA, Ferreira ME, Simancas LC.** Chagas disease vector control through different intervention modalities in endemic localities of Paraguay. *Bull World Health Organ.* 1999;77:331-9.
78. **Gürtler RE, Yadón ZE.** Eco-bio-social research on community-based approaches for Chagas disease vector control in Latin America. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015;109:91-8. <http://dx.doi.org/10.1093/trstmh/tru203>
79. **Waleckx E, Cámara-Mejía J, Ramírez-Sierra MJ, Cruz-Chan V, Rosado-Vallado M, Vázquez-Narváez S, et al.** An innovative ecohealth intervention for Chagas disease vector control in Yucatán, México. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015;109:143-9. <http://dx.doi.org/10.1093/trstmh/tru200>
80. **De Urioste-Stone SM, Pennington PM, Pellecer E, Aguilar TM, Samayoa G, Perdomo HD, et al.** Development of a community-based intervention for the control of Chagas disease based on peridomestic animal management: An eco-bio-social perspective. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015;109:159-67. <http://dx.doi.org/10.1093/trstmh/tru202>
81. **Organización Panamericana de la Salud.** Grupo de trabajo OPS para consulta en planificación, operativa, estrategia y evaluación de etapas avanzadas del control antivectorial en enfermedad de Chagas. Montevideo: OPS; 2001.
82. **Magnani C, Días JC, Gontijo ED.** How health activities view man and how man rethinks them: An anthropological analysis of Chagas disease control. *Cad Saúde Pública.* 2009;25:1947-56. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2009000900009>
83. **Red Chagas Colombia.** Programa Nacional de Investigación para la Prevención, Control y Tratamiento Integral de la enfermedad de Chagas en Colombia 2012-2020. Fecha de consulta: 3 de diciembre de 2016. Disponible en: <http://www.redchagascolombia.org/quienes-somos/presentacion>.

## HAGA USTED EL DIAGNÓSTICO

# Hombre de 66 años con nódulos exulcerados del codo de cuatro años de evolución

## Segunda parte

Gerzaín Rodríguez

Grupo de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia

El diagnóstico correcto es dermatitis y adenitis por micobacteria atípica, probablemente *Mycobacterium avium-intracellulare*.

### Comentario

En resumen, el paciente presentaba pocas lesiones pápulo-nodulares en el codo izquierdo, de cuatro años de evolución, con una adenopatía epitroclear satélite discreta. El cuadro clínico no sugería una entidad precisa, y en las biopsias cutáneas se observó una lesión intradérmica, bien circunscrita, con abundantes células fusiformes, algunos macrófagos vacuolados y pocas células gigantes de tipo Touton. Llamó la atención la presencia de abscesos y de áreas de necrosis, el esbozo de granulomas epitelioides y la abundancia de plasmocitos en la profundidad de la lesión. Pocos nervios estaban rodeados por el infiltrado, pero su estructura endoneural estaba bien preservada.

Se sospechó un tumor fusocelular y un leproma histioide, el cual cursa con células fusiformes, entre las cuales la presencia de algunos plasmocitos es una clave o ayuda diagnóstica (1,2).

Las coloraciones de ZN y PAS revelaron un enorme número de bacilos positivos, por lo cual se sugirieron los diagnósticos de lepra lepromatosa y de nódulos por micobacterias atípicas. La revisión de las biopsias permitió demostrar que los nervios estaban bien preservados y que no contenían bacilos, lo cual descartaba de manera absoluta la presencia de lepra. Los nervios son los tejidos en donde los bacilos de Hansen son más abundantes

(1). *Mycobacterium avium-intracellulare* es claramente positivo para PAS (3,4), debido a los carbohidratos unidos a los lípidos de su pared celular (3), por lo cual se sugirió esta micobacteriosis atípica. La reacción positiva con PAS también se ha demostrado en *M. gordonae* (5), así como en *M. leprae* (6).

La micobacteria presente en este caso se podría identificar con la técnica de PCR a partir de los bloques de parafina, proceso que se puede hacer en un día (7) y del que no se disponía.

Ante este diagnóstico, el caso debe estudiarse ampliamente para determinar si hay lesiones diseminadas por la micobacteria (pulmón, ganglios cervicales, tejido óseo), si el paciente tiene inmunosupresión (sida, leucemia, lupus eritematoso sistémico, diabetes) o tratamiento con esteroides, inmunosupresores o inmunomoduladores, como infliximab, etanercept o adalimumab (7-13). Se debe hacer cultivo de las lesiones cutáneas, de esputo, orina y sangre, para determinar si hay micobacteriosis diseminada (8-10). Una vez aislado en cultivo el germen causal, se debe establecer su sensibilidad frente a los antibióticos antituberculosos y administrar tratamiento con dos o más medicamentos según este resultado, durante 6 a 12 meses, y prolongarlo dos meses más después de la curación clínica (12,14,15). Como el germen puede ser de crecimiento lento en el cultivo, el tratamiento debe iniciarse antes de contar con el resultado e incluir dos o más medicamentos antituberculosos, preferentemente claritromicina y etambutol (13,14). Puede llegar a requerirse la extirpación de las lesiones que no involucionen completamente con el tratamiento.

Según información del paciente, a los tres meses del diagnóstico aún no le habían hecho exámenes complementarios. Se le prescribió claritromicina, con lo cual sintió que se había curado, y el tratamiento no se prolongó. El paciente no padecía ninguna enfermedad inmunosupresora, no era diabético y

### Correspondencia:

Gerzaín Rodríguez, Grupo de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Campus del Puente del Común, Km 7 Autopista Norte de Bogotá, Chía, Colombia  
Teléfono: (571) 861 5555, extensión 23339; fax (571) 861 5555, extensión 2626  
[gerzainrodriguez@gmail.com](mailto:gerzainrodriguez@gmail.com)

Recibido: 26/05/16; aceptado: 05/10/16

no usaba medicamentos diferentes a los del tratamiento para la hipertensión arterial sistémica. Cinco años antes, había sido sometido a colecistectomía y, cuatro, a prostatectomía. El paciente decía gozar de buena salud y no había antecedentes de trauma en el sitio de las lesiones cutáneas.

Las micobacterias atípicas, las no tuberculosas o las ambientales, comprenden más de 130 especies cultivables que no se transmiten de hombre a hombre (8,10,13,14). Fueron clasificadas por Runyon desde los años 50 como de crecimiento lento, cuando su desarrollo en el cultivo toma más de un mes, y de crecimiento rápido, cuando este se demora 10 a 15 días.

Entre las de crecimiento lento pueden darse colonias con color o sin él, con base en lo cual se subdividen en cromógenas, no cromógenas y escotocromógenas (4,8,16,17). Son gérmenes ubicuos, presentes en el agua corriente, así como en albercas, piscinas, tinas, acuarios, *jacuzzis*, suelo, piso casero y muchos otros sitios, así como en heces de animales (8,13,16-18). Afectan a los humanos a partir de los tres años de edad y penetran en el organismo por inhalación, ingestión o trauma cutáneo (8,13,16-18).

Las micobacterias de crecimiento rápido se aprovechan más comúnmente de este último, y han originado epidemias a partir de su propagación por acupunturas, venoclisis y mesoterapia (16,19).

Otras, como *M. avium-intracellulare*, han aumentado por la aparición del sida y debido a condiciones inmunosupresoras (20), aunque también pueden afectar a personas con un estado inmunitario aparentemente normal, quienes presentan lesiones cutáneas localizadas, diseminadas o generalizadas (8,15,21,22).

*Mycobacterium avium-intracellulare* es un agente patógeno frecuente en pacientes con sida que no reciben tratamiento antirretroviral, en quienes también se presentan candidiasis, pneumocistosis y enfermedad por el virus de inclusión citomegálica (9). La piel se ve afectada cuando hay diseminación hematógona de una enfermedad multisistémica, se ha hecho drenaje de una adenopatía subyacente o ha habido una inoculación local traumática (7,13). Las lesiones aparecen como pápulas, úlceras, senos de drenaje y, con mayor frecuencia, como nódulos e hipodermis (15,16,23-26). Pueden presentarse lesiones varioliformes (24), generalizadas o diseminadas, estas últimas más aparentes en pacientes inmunosuprimidos (21,22).

En algunos casos se presentan como formas esporotricoides, linfangíticas (27,28). La enfermedad puede tener cronicidad notoria, de años, sin diseminarse, como ocurrió en este paciente (21,29).

La extensión hipodérmica es más común en personas inmunosuprimidas. Las lesiones del paciente cuyo caso se analiza eran intradérmicas y bien circunscritas, lo cual sugería que no había inmunosupresión pero, en cambio, la abundancia de gérmenes, sí. En los pacientes con lesiones cutáneas por *M. avium-intracellulare*, sin inmunosupresión, es difícil demostrar los gérmenes en el examen directo o en la biopsia, por lo cual el cultivo es un procedimiento esencial (7,26).

Las lesiones cutáneas por este microorganismo en pacientes con sida predominan cuando tienen menos de 100 linfocitos T por mm<sup>3</sup> y también aparecen como nódulos subcutáneos múltiples cuando el paciente recibe terapia antirretroviral de gran actividad (*Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART*), como expresión del síndrome de reconstitución inmunológica (30,31).

El aspecto fusiforme de los macrófagos del infiltrado es otra característica de las infecciones por micobacterias atípicas, especialmente en pacientes inmunosuprimidos, que las asemejan a la lepra histioide y a tumores fusocelulares, tanto en la piel como en los ganglios linfáticos (4,32-36) (Lee B, Lee HY, Yap WM, Chuah KL. Mycobacterial inflammatory pseudotumor of the neck. A potential diagnostic pitfall. *Pathology*. 2013;45(Supl.1):S74. Australasian Division of the International Academy of Pathology Abstracts, 37th Annual Scientific Meeting 2012. <http://dx.doi.org/10.1097/01.PAT.000426903.63425.1b>).

La presencia de algunos plasmocitos entre las células fusiformes se considera una clave diagnóstica para la lepra histioide (1,2). Este es un mensaje importante y útil para el patólogo, que se desprende del análisis del caso.

Ante estos hallazgos, se deben solicitar coloraciones especiales como la de ZN, PAS y Grocott. La asombrosa positividad de las dos primeras no descarta la lepra, pues el bacilo de Hansen también es positivo con la tinción de PAS (6). La presencia de bacilos intraneurales y el daño neural indican la presencia de lepra, pues ninguna otra bacteria produce estos cambios. La de plata metenamina tiñe también los bacilos de Hansen (6,36,37) y tiñó, asimismo, los bacilos en la lesión estudiada. Los

bacilos positivos tanto con ZN como con PAS se consideraron como indicativos de la presencia de *M. avium-intracellulare* (3), pero dicha positividad también se ha demostrado con *M. gordonae* (14) y *M. leprae* (6).

Una conclusión general útil es que la presencia de bacilos abundantes, fagocitados, semejantes o análogos a globias, que sean positivos con ZN y PAS, puede corresponder a lepra o a una micobacteria atípica, que debe confirmarse mediante cultivo o PCR. El daño neural y la presencia de bacilos intraneurales solo ocurren en la lepra.

### Conflicto de intereses

El autor declara que no existe ningún conflicto de interés.

### Financiación

Facultad de Medicina de la Universidad de La Sabana

### Referencias

- Rodríguez G, Pinto R. La lepra. Imágenes y conceptos. Medellín: Universidad de Antioquia, Universidad de La Sabana; 2007.
- Rodríguez G, Henríquez R, Gallo S, Panqueva JC. Histoid leprosy with giant lesions of fingers and toes. *Biomédica*. 2015;35:165-70. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2562>
- Papolla MA, Mehta VT. PAS reaction stains phagocytosed atypical mycobacteria in paraffin sections. *Arch Pathol Lab Med*. 1984;108:372-3.
- Wood C, Nickoloff BJ, Todes-Taylor N. Pseudotumor resulting from atypical mycobacterial infection: A "histoid" variety of *Mycobacterium avium intracellulare* complex infection. *Am J Clin Pathol*. 1985;83:524-7. <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/83.4.524>
- Perrin C, Michiels JF, Bernard E, Hoffman P, Rosenthal E, Loubiere R. Cutaneous spindle-cell pseudotumors due to *Mycobacterium gordonae* and *Leishmania infantum*: An immunophenotypic study. *Am J Dermatopathol*. 1993;15:553-8.
- Xavier-Junior JC, Ocanha JP, Marques ME, Marques SA. *Mycobacterium leprae* is usually positive to periodic acid-Schiff and Grocott stains. *Am J Dermatopathol*. 2016;38:322-4. <http://dx.doi.org/10.1097/DAD.0000000000000360>
- Ichiki Y, Hirose M, Akiyama T, Esaki C, Kitajima Y. Skin infection caused by *Mycobacterium avium*. *Br J Dermatol*. 1997;136:260-3. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2133.1997.d01-1183.x>
- Horsburgh Jr CR, Mason III GU, Farhi DC, Iseman MD. Disseminated infection with *Mycobacterium avium-intracellulare*. A report of 13 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1985;64:36-48.
- Maurice P, Bunker C, Giles F, Goldstone A, Holton J. *Mycobacterium avium-intracellulare* infection associated with hairy-cell leukemias. *Arch Dermatol*. 1988;124:1545-9.
- Street ML, Umbert-Millet IJ, Roberts GD, Su DWP. Nontuberculous mycobacterial infections of the skin. Report of fourteen cases and review of the literature. *J Am Acad Dermatol*. 1991;24:208-15. <http://dx.doi.org/10.1001/archderm.1988.01670100047012>
- Kakinuma H, Suzuki H. *Mycobacterium avium* complex infection limited to the skin in a patient with systemic lupus erythematosus. *Br J Dermatol*. 1994;130:785-90. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.1994.tb03420.x>
- Touma Z, Haddad A, Gladman DD, Uleryk EM, Urowitz MB. Skin nontuberculous mycobacterial infection in systemic lupus erythematosus: An unusual skin infection mimicking lupus vasculitis. *Semin Arthritis Rheum*. 2013;42:498-506. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semarthrit.2012.08.002>
- Bhambri S, Bhambri A, Del Rosso JQ. Atypical mycobacterial cutaneous infections. *Dermatol Clin* 2009;27:63-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2008.07.009>
- Guyot A, Descamps V, Crickx B. Mycobacterioses atypiques cutanées. *Revue du Rhumatisme Monographies*. 2011;78:173-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.monrhu.2011.03.007>
- Tsai YY, Hsueh PR, Hsiao CH, Tsai TS. Cutaneous *Mycobacterium intracellulare* infection presenting as multiple asymptomatic papulonodules in an immunocompetent adult. A case report and review of the literature. *Dermatologica Sinica*. 2013;31:82-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsi.2012.06.007>
- Inderlied CB, Kemper CA, Bermúdez L. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev*. 1993;6:266-310. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.6.3.266>
- Grayson W. Infectious diseases of the skin. In: Calonje E, Brenn T, Lazar A, McKee PH, editors. *McKee's pathology of the skin*. Fourth edition. London: Elsevier; 2012. p. 760.
- Sugita Y, Ishi N, Katsuno M, Yamada R, Nakajima H. Familiar cluster of cutaneous *Mycobacterium avium* infection resulting from use of a circulating, constantly heated bath water system. *Br J Dermatol*. 2000;142:789-93. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2133.2000.03428.x>
- Rodríguez G, Ortegón M, Camargo C, Orozco LC. Iatrogenic *Mycobacterium abscessus* infection: Histopathology of 71 patients. *Br J Dermatol*. 1997;137:214-8. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2133.1997.18081891.x>
- Wentworth AB, Drage LA, Wengenack NL, Wilson JW, Lohse CM. Increased incidence of cutaneous nontuberculous mycobacterial infection, 1980 to 2009: A population-based study. *Mayo Clin Proc*. 2013;88:38-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2012.06.029>
- Satta R, Retanda G, Cotoni F. *Mycobacterium avium* complex: Cutaneous infection in an immunocompetent host. *Acta Derm Venereol*. 1999;79:249-50.
- Epps RE, el-Azhary RA, Hellinger RA, Hellinger WC, Winkelmann RK, Vanscoy RE. Disseminated cutaneous *Mycobacterium avium-intracellulare* resembling sarcoidosis. *J Am Acad Dermatol*. 1995;33:528-31. [http://dx.doi.org/10.1016/0190-9622\(95\)91407-2](http://dx.doi.org/10.1016/0190-9622(95)91407-2)
- Neodorost St, Elewski G, Tromford JW, Carmisa C. Rosacea-like lesions due to familial *Mycobacterium avium-intracellulare* infection. *Int J Dermatol*. 1991;30:491-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4362.1991.tb04869.x>

24. **Bachelez H, Ducloy G, Pinquier L, Rouveau M, Sibilla M, Dubertret I.** Disseminated varioliform pustular eruption due to *Mycobacterium avium intracellulare* in an HIV-infected patient. *Br J Dermatol.* 1996;134:801-3. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2133.1996.101814.x>
25. **Tortoli E.** Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:906-10. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03014.x>
26. **Fujii K, Ohta K, Kuze F.** Multiple primary *Mycobacterium avium* infection of the skin. *Int J Dermatol.* 1997;36:54-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4362.1997.tb03306.x>
27. **Glickman FS.** Sporotrichoid mycobacterial infections. Case report and review. *J Am Acad Dermatol.* 1983;8:703-7.
28. **Kayal JD, McCall CO.** Sporotrichoid cutaneous *Mycobacterium avium complex* infection. *J Am Acad Dermatol.* 2002;47(Supl.5):S249-50.
29. **Hide M, Hondo T, Yonehara S, Motohiros Y, Okano S.** Infection with *Mycobacterium avium-intracellulare* with abscess, ulceration and fistula formation. *Br J Dermatol.* 1997;136:121-3. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2133.1997.4921430.x>
30. **Del Giudice P, Durant J, Counillon E, Mondain V, Bernard E.** Mycobacterial cutaneous manifestations: A new sign of immune restoration syndrome in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Dermatol.* 1999;135:1129-30.
31. **Bachmeyer C, Thibaut M, Khuoy L, Danne O, Blum L.** Subcutaneous and muscular abscesses due to *Mycobacterium avium intracellulare* in a patient with AIDS and manifestation of immune restoration. *Br J Dermatol.* 2004;150:397-8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2003.05797.x>
32. **Cole CW, Gebhard J.** *Mycobacterium avium* infection of the skin resembling lepromatous leprosy. *Br J Dermatol.* 1979;101:71-4. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.1979.tb15295.x>
33. **Boyd A, Robbins J.** Cutaneous *Mycobacterium avium intracellulare* infection in an HIV+ patient mimicking histoid leprosy. *Am J Dermatopathol.* 2005;27:39-41.
34. **Logan S, Lucas D, Cheng J, Ioachin H, Adsay NV.** Spindle cell tumors associated with mycobacteria in lymph nodes of HIV positive patients: "Kaposi sarcoma with mycobacteria" and "Mycobacterial pseudotumor". *Am J Surg Pathol.* 1999;23:656-61.
35. **Shiomi T, Yamamoto T, Manabe T.** Mycobacterial spindle cell pseudotumor of the skin. *J Cutan Pathol.* 2007;34:346-51. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0560.2006.00611.x>
36. **Yeh I, Evan G, Jokinen C.** Cutaneous mycobacterial spindle cell pseudotumor: A potential mimic of soft tissue neoplasms. *Am J Dermatopathol.* 2011;33:e66-e99. <http://dx.doi.org/10.1097/DAD.0b013e3182120ae3>
37. **Rodríguez G.** Adenopatías generalizadas como presentación de la reacción leprótica tipo 2. *Biomédica.* 2003;23:373-87. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v23i4.1231>

## Comentario bibliográfico

### "Las leishmaniasis: atlas y texto"

Este libro, elegantemente diseñado y diagramado por David A. Hernández y pulcramente impreso por Panamericana Formas e Impresos, S. A., bajo el patrocinio del Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, es una obra de singular importancia, no solamente por estar centrada en un tema de gran interés médico, sino porque esta enfermedad y sus diversas formas constituyen un serio problema de salud pública para Colombia debido a la gran frecuencia con que ocurren y a su presencia en todos los departamentos del territorio nacional, con excepción de San Andrés y Providencia.

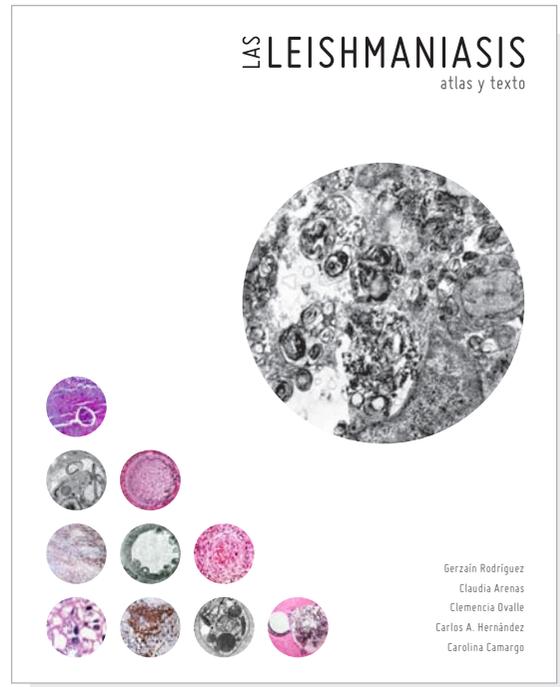
Sus autores, Gerzain Rodríguez, Claudia Arenas, Clemencia Ovalle, Carlos A. Hernández y Carolina Camargo, han realizado un trabajo que sorprende por la prolijidad en cada uno de los aspectos, la profundidad de los textos y la seriedad científica con la cual se presenta cada tema.

Organizado en doce capítulos que cubren desde los aspectos históricos hasta la prevención, en cada uno de ellos se aborda un tema específico de forma muy clara, didáctica y, además, con la profundidad necesaria para satisfacer al más exigente de los lectores; la redacción ágil y el buen uso del español hacen su lectura muy placentera. Cada uno de los capítulos se sustenta en un abundante listado de lecturas recomendadas que han aparecido en publicaciones científicas de reconocido prestigio, todas ellas actuales y de gran relevancia.

Cabe destacar el capítulo dedicado a la patogenia, en el cual se detallan los mecanismos moleculares básicos involucrados en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa frente al protozooario, los cuales, en definitiva, son los que explican el amplio espectro de las presentaciones clínicas, desde las asintomáticas hasta aquellas graves difusas.

Otro capítulo que debe resaltarse es el dedicado al diagnóstico diferencial, en el cual se incluyen las numerosas variantes de la enfermedad, algunas de las cuales son ignoradas en ocasiones, lo que resalta el hecho de que el diagnóstico de la leishmaniasis no siempre es fácil.

Dada su calidad de atlas, el libro presenta un material de excepcional valor por la cantidad de figuras de extraordinaria calidad, entre las cuales las de microscopía electrónica presentan detalles que, probablemente, es la primera vez que son precisados.



Los estudios histopatológicos presentan exhaustivamente todos los efectos y los cambios que la infección del protozooario ocasiona en las células afectadas, pero, además, el lector se encuentra con sorpresas como las preparaciones del primer caso de leishmaniasis visceral estudiado en Colombia, cuyo corte de hígado, el diagramador tuvo el buen juicio de destacar en página entera.

Las figuras de las distintas formas clínicas son, en general, de muy buena calidad y, muy seguramente, ilustran todas las formas de leishmaniasis que se ven en Colombia.

El libro incluye al final cinco apéndices: cuatro dedicados a detallar minuciosamente los distintos procedimientos de laboratorio útiles para precisar el diagnóstico etiológico: desde el simple examen directo hasta las sofisticadas técnicas de biología molecular, y el quinto apéndice presenta un listado de los distintos departamentos y municipios en los cuales se ha informado la presencia de leishmaniasis visceral.

En conclusión, este es un texto que no debería faltar en la biblioteca de todos aquellos que se interesan en los problemas de la salud humana y, desde luego, de quienes tienen la responsabilidad de formar a los profesionales de la salud.

Miguel A. Guzmán  
Investigador Emérito, Instituto Nacional de Salud,  
Bogotá, D.C., Colombia

## 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](http://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 galeradas 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](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](mailto: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

- |   |  |                                       |
|---|--|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Artículo original    | <input type="checkbox"/> Comunicación breve        | <input type="checkbox"/> Nota técnica |
| <input type="checkbox"/> Revisión de tema     | <input type="checkbox"/> Reseña histórica          | <input type="checkbox"/> Ensayo       |
| <input type="checkbox"/> Comentario           | <input type="checkbox"/> Imágenes en biomedicina   |                                       |
| <input type="checkbox"/> Presentación de caso | <input type="checkbox"/> Haga usted el diagnóstico |                                       |
| <input type="checkbox"/> Carta al editor      | <input type="checkbox"/> 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](http://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](mailto: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

- |   |  |   |
|---|--|---|
| <input type="checkbox"/> Original article     | <input type="checkbox"/> Short communication     | <input type="checkbox"/> Technical note |
| <input type="checkbox"/> Topic review         | <input type="checkbox"/> Historical paper        | <input type="checkbox"/> Essay          |
| <input type="checkbox"/> Commentary           | <input type="checkbox"/> Images in biomedicine   |   |
| <input type="checkbox"/> Case presentation    | <input type="checkbox"/> Make your own diagnosis |   |
| <input type="checkbox"/> Letter to the editor | <input type="checkbox"/> 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.