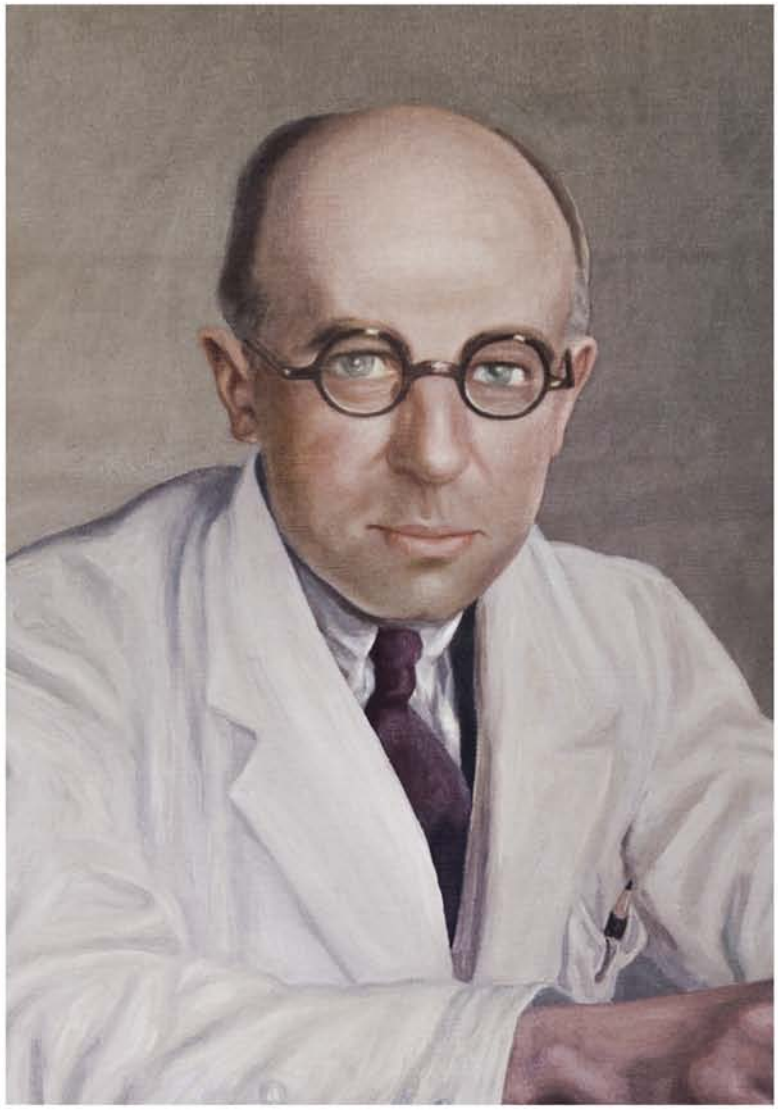
ISSN 0120-4157

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 37, No. 1 - Enero de 2017
Bogotá, D.C., Colombia, S.A.



Portada: Jorge Martínez Santamaría y Bernardo Samper Sordo, fundadores del Laboratorio de Higiene de Samper y Martínez, 24 de enero de 1917.

Detalle de los cuadros originales, Museo Bernardo Samper Sordo, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Fotografía y edición digital, David Arturo Hernández, Bogotá, D.C., Colombia

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 37, No. 1, Bogotá, D.C., Colombia - Enero 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
Medelín, 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

Impresión: Imprenta Nacional de Colombia

Contenido

Editorial

El Instituto Nacional de Salud, una institución paradigmática
José Félix Patiño Restrepo 5

Presentación de caso

Cáncer de pulmón de células pequeñas asociado a múltiples síndromes paraneoplásicos
Diana L. Franco, Leslie Thomas 8

Artículo original

Síntesis de nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con antibióticos y su actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
Mónica Tatiana Herrera, Jhon Jhamilton Artunduaga, Claudia Cristina Ortiz, Rodrigo Gonzalo Torres 11

Genotipos circulantes del virus de la hepatitis C en Colombia
Óscar Santos, Alberto Gómez, Viviana Vizcaíno, María Consuelo Casas, María del Pilar Ramírez, Patricia Olaya 22

Descripción de las mutaciones de *Mycobacterium tuberculosis* que confieren resistencia a rifampicina e isoniacida detectadas mediante GenoType® MTBDR*plus* V.2 en Colombia
Claudia Llerena, Raquel Medina 28

Seroprevalencia de la infección por dengue en los municipios de Armenia, Calarcá, La Tebaida y Montenegro en el departamento del Quindío, 2014
Mónica Marcela Jiménez, Jesús Arias, Gabriel Carrasquilla 34

Diversidad de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) en Santander, Colombia: implicaciones epidemiológicas
Lyda Esteban, José Mauricio Montes, Víctor Manuel Angulo 42

Perfil clínico y demográfico y factores de riesgo frente a la infección por *Clostridium difficile*
Carlos Carvajal, Carlos Pacheco, Fabián Jaimes 53

Características sociodemográficas y clínicas de pacientes con infección por *Leptospira* spp. atendidos en cuatro centros hospitalarios de Medellín, Colombia, 2008-2013
Lina María Echeverri-Toro, Sara Penagos, Laura Castañeda, Pablo Villa, Santiago Atehortúa, Faiver Ramírez, Carlos Restrepo, Sigifredo Ospina, Yuli Agudelo, Alicia Hidrón, Paola Agudelo, Eliana Valderrama, Carlos Andrés Agudelo 62

Riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas por intrusión de triatominos y mamíferos silvestres en Bucaramanga, Santander, Colombia
Marlene Reyes, Ángela Torres, Lyda Esteban, Mónica Flórez, Víctor Manuel Angulo 68

Hallazgos patológicos en adenopatías de pacientes con infección por HIV
Federico Rodríguez-Vega, Miguel Botero, Jorge Alberto Cortés, Ángela Tobón 79

Caracterización de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos de individuos positivos para HIV en Colombia, 2012
Claudia Castro, Alba Ricardo, Angie Zabaleta, Claudia Llerena, Gloria Puerto 86

Prevalencia de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a quinolonas y fármacos inyectables en Colombia, 2012-2013
Claudia Llerena, Angie Zabaleta, Angélica Valbuena, Martha Murcia 96

Adaptación transcultural del cuestionario de puntuación de la neumonía adquirida en la comunidad en pacientes con neumonía leve a moderada en Colombia
Mónica Alejandra Bernal-Vargas, Jorge Alberto Cortés, Ricardo Sánchez 104

Aloinjertos análogos de mucosa bucal en ratas no consanguíneas
Luis González, Karla Padrón, Siham Salmen, Elsy Jerez, Lorena Dávila, Eduvigis Solórzano 111

Activación de STAT3 por hipoxia en modelos *in vitro* de cáncer de cuello uterino y en células endoteliales
Óscar Ortega, Alejandro Ondo-Méndez, Ruth Garzón 119

Nota técnica

Anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante NS3 del virus del dengue
Liliana Morales, Myriam L. Velandia, María Angélica Calderón, Jaime E. Castellanos, Jacqueline Chaparro-Olaya 131

Instrucciones a los autores

Contents

Editorial

The *Instituto Nacional de Salud*, a emblematic institution
José Félix Patiño Restrepo 5

Case presentation

Small cell lung cancer associated with multiple paraneoplastic syndromes
Diana L. Franco, Leslie Thomas 8

Original articles

Synthesis of antibiotic loaded polylactic acid nanoparticles and their antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
Mónica Tatiana Herrera, Jhon Jhamilton Artunduaga, Claudia Cristina Ortiz, Rodrigo Gonzalo Torres 11

Hepatitis C virus genotypes circulating in Colombia
Óscar Santos, Alberto Gómez, Viviana Vizcaíno, María Consuelo Casas, María del Pilar Ramírez, Patricia Olaya 22

Description of *Mycobacterium tuberculosis* mutations conferring resistance to rifampicin and isoniazid detected by GenoType® MTBDR*plus* V.2 in Colombia
Claudia Llerena, Raquel Medina 28

Seroprevalence of dengue infection in the municipalities of Armenia, Calarcá, La Tebaida and Montenegro in Quindío, 2014
Mónica Marcela Jiménez, Jesús Arias, Gabriel Carrasquilla 34

Diversity of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Santander, Colombia: Epidemiological implications
Lyda Esteban, José Mauricio Montes, Víctor Manuel Angulo 42

Clinical and demographic profile and risk factors for *Clostridium difficile* infection
Carlos Carvajal, Carlos Pacheco, Fabián Jaimes 53

Sociodemographic and clinical characteristics of patients infected with *Leptospira* spp. treated at four hospitals in Medellín, Colombia, 2008-2013
Lina María Echeverri-Toro, Sara Penagos, Laura Castañeda, Pablo Villa, Santiago Atehortúa, Faiver Ramírez, Carlos Restrepo, Sigifredo Ospina, Yuli Agudelo, Alicia Hidrón, Paola Agudelo, Eliana Valderrama, Carlos Andrés Agudelo 62

Risk of transmission of Chagas disease by intrusion of triatomines and wild mammals in Bucaramanga, Santander, Colombia
Marlene Reyes, Ángela Torres, Lyda Esteban, Mónica Flórez, Víctor Manuel Angulo 68

Pathological findings in patients with HIV infection and lymphadenopathies
Federico Rodríguez-Vega, Miguel Botero, Jorge Alberto Cortés, Ángela Tobón 79

Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from HIV positive individuals in Colombia, 2012
Claudia Castro, Alba Ricardo, Angie Zabaleta, Claudia Llerena, Gloria Puerto 86

Prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to quinolones and injectables in Colombia, 2012-2013
Claudia Llerena, Angie Zabaleta, Angélica Valbuena, Martha Murcia 96

Cross-cultural adaptation of the community-acquired pneumonia score questionnaire in patients with mild-to-moderate pneumonia in Colombia
Mónica Alejandra Bernal-Vargas, Jorge Alberto Cortés, Ricardo Sánchez 104

Oral mucosa analog allografts in non-consanguineous rats
Luis González, Karla Padrón, Siham Salmen, Elsy Jerez, Lorena Dávila, Eduvigis Solórzano 111

STAT3 activation by hypoxia in *in vitro* models of cervix cancer and endothelial cells
Óscar Ortega, Alejandro Ondo-Méndez, Ruth Garzón 119

Technical note

Polyclonal antibodies against recombinant dengue virus NS3 protein
Liliana Morales, Myriam L. Velandia, María Angélica Calderón, Jaime E. Castellanos, Jacqueline Chaparro-Olaya 131

Instructions for authors

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 37, No. 1, Bogotá, D.C., Colombia - Enero de 2017

Editorial

El Instituto Nacional de Salud, una institución paradigmática

Emblemático, paradigmático. En pasada ocasión, cuando el Instituto Nacional de Salud, al cumplir 94 años de existencia, celebró el XII Encuentro Científico en agosto del año 2011, me referí a esta benemérita institución como "emblemática" (1). El vocablo "emblemático" significa simbólico, alegórico, ejemplar, representativo. El Instituto Nacional de Salud ha sido un emblema, y es ejemplo y paradigma de excelencia científica en Colombia y en América Latina.

En el capítulo "Una visión desde el Consejo Científico-Técnico" de la magnífica obra "Instituto Nacional de Salud, 1917-1997. Una historia, un compromiso", editada por Gabriel Toro, Carlos A. Hernández y Jorge Raad, Mauricio Restrepo escribió:

> "[…] La permanencia a través del tiempo es un hecho que causa sorpresa y, con frecuencia, admiración. El hecho mencionado se puede aplicar al Instituto Nacional de Salud […]" (2).

Tal escribió Restrepo con ocasión de los 80 años de existencia del Instituto; hoy, celebramos los 100 años y, con ello, sus palabras adquieren mayor significación.

Las culturas de los pueblos se desarrollan y pasan a la historia por la acción de hombres y mujeres notables, y de grandes instituciones. El Instituto Nacional de Salud ha congregado lo mejor de la inteligencia médica y sus aportes a la salud de nuestra nación han sido muy significativos. El Instituto es supremo hacedor y guardián de la ciencia biomédica y de la salud pública de Colombia.

Fundado como entidad privada en enero de 1917 por dos grandes de la medicina colombiana, Bernardo Samper Sordo y Jorge Martínez Santamaría, el Instituto muy pronto se convirtió en un reconocido centro de investigación científica, y de elaboración de vacunas y sueros para la salud pública. En 1928, el Gobierno Nacional lo adquirió y lo denominó Laboratorio Nacional de Higiene, el cual luego se fusionó con el Instituto Carlos Finlay para el estudio de la fiebre amarilla, y con sucesivas restructuraciones finalmente vino a ser el hoy Instituto Nacional de Salud. Su publicación periódica, *Biomédica*, está en el *Index Medicus* (Medline, PubMed) de la *National Library of Medicine* y es la más importante publicación científica colombiana en el campo de la biomedicina. El *Boletín Epidemiológico Semanal* es el aporte indispensable para conocer el estado de salud del país y para la planeación de los servicios de salud (1).

Grande ha sido el impacto del Instituto sobre la salud de Colombia: la erradicación de la viruela y de la poliomielitis, el Saneamiento Básico Rural, la construcción de acueductos y la disposición de excretas, así como la investigación epidemiológica. En fin, es la institución faro de la salud pública y ha sido centro principal de investigación en el país, y de sus investigaciones han surgido las más ambiciosas y benéficas campañas –hoy de dimensión histórica–, como el control del paludismo o la erradicación de *Aedes aegypti*, vector de la fiebre amarilla (1).

En Colombia, como en otros países de Latinoamérica, el Instituto Nacional de Salud está comprometido en la generación de conocimiento científico que sustente la adopción de medidas y estrategias de salud pública. Por ejemplo, el Instituto Nacional de Salud Pública de México se presenta como

> "[…] una institución comprometida con el desafío que supone responder a las múltiples demandas que se le plantean desde la sociedad y desde las instancias gubernamentales. De acuerdo con esta óptica, las actividades del INSP, orientadas principalmente a la promoción de la salud de la población mediante la aplicación de políticas basadas en evidencias científicas, se apegan a lineamientos que delimitan y orientan su trabajo como la Visión 2030 del Sistema de Salud Mexicano, que contempla un sistema único de salud que garantice el acceso universal a los servicios esenciales de salud […]" (3).

El Instituto Nacional de Salud de Colombia funciona actualmente bajo los lineamientos del Decreto Ley 4109 de 2011, que reza así en los Considerandos:

> "[…] El Instituto Nacional de Salud está organizado como un establecimiento público de la Rama Ejecutiva del orden nacional que tiene como objetivo promover, orientar, ejecutar y coordinar la investigación científica en salud y en biomedicina; desarrollar, aplicar y transferir ciencia y tecnología en las áreas de su competencia; actuar como laboratorio de referencia nacional; coordinar técnicamente la red nacional de laboratorios de salud pública en las áreas de su competencia, y desarrollar, producir y distribuir productos biológicos, químicos, biotecnológicos y reactivos de diagnóstico biomédico, en el marco del Sistema de Seguridad Social en Salud y del Sistema de Ciencia, Tecnología e Innovación […]" (4).

En el Artículo 1° se redefine su naturaleza jurídica, así:

> "[…] Cámbiese la naturaleza jurídica del Instituto Nacional de Salud – INS, de establecimiento público a Instituto Científico y Técnico, con personería jurídica, autonomía administrativa y patrimonio propio, que se continuará denominando Instituto Nacional de Salud - INS, adscrito al Ministerio de Salud y Protección Social. El Instituto pertenecerá al Sistema General de Seguridad Social en Salud y al Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación en los términos establecidos en la ley y en el presente Decreto […]" (4).

En este contexto, el Artículo 3° reformula su objeto así:

> "[…] (i) el desarrollo y la gestión del conocimiento científico en salud y biomedicina para contribuir a mejorar las condiciones de salud de las personas; (ii) realizar investigación científica básica y aplicada en salud y biomedicina; (iii) la promoción de la investigación científica, la innovación y la formulación de estudios de acuerdo con las prioridades de salud pública de conocimiento del Instituto; (iv) la vigilancia y seguridad sanitaria en los temas de su competencia; la producción de insumos y biológicos; y (v) actuar como laboratorio nacional de referencia y coordinador de las redes especiales, en el marco del Sistema General de Seguridad Social en Salud y del Sistema de Ciencia, Tecnología e Innovación […]" (4)

Además de su principal rol, que es la generación de conocimiento sobre la naturaleza, la fisiopatología y la epidemiología de las enfermedades de mayor riesgo para la población de Colombia, el Instituto debe orientar las acciones de prevención, diagnóstico y tratamiento, y coordinar los programas de especial valor para la salud pública del país: la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, la Red de Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión, y la Red Nacional de Donación y Trasplante de Tejidos y Órganos.

Como víctima de las fallidas políticas económicas neoliberales, infortunadamente, el Instituto no ha recibido en los últimos tiempos el soporte presupuestal que requiere. En el gobierno anterior se pretendió que, como otros en las diversas ramas de la actividad cultural y científica del país, fuera autosuficiente desde el punto de vista presupuestal. Esto quiere decir que los otrora muy importantes proyectos de investigación, la producción de biológicos y vacunas, en fin, su accionar como faro de la salud pública de nuestra nación, han decaído. En junio de 2009, la revista *Semana* se refirió a las dificultades del Instituto en un artículo bajo el injusto y equivocado título "El Instituto Nacional de Salud incumplió sus obligaciones" (5), y la Contraloría General de la República acogió las denuncias de *Semana*, aunque ambas, *Semana* y Contraloría, reconocieron y detallaron la precaria situación económica a la que se ha llevado al Instituto y que ha sido la verdadera causa de la dificultad para cumplir plenamente su misión.

Es tiempo de apoyar con decisión, como política gubernamental, la investigación científica, la coordinación para la excelencia en los programas, como los de bancos de sangre o de trasplante de tejidos y órganos, que el Instituto ejecuta en medio de grandes limitaciones presupuestales. Pero es preocupante lo que establecen el Artículo 1° y el Artículo 3° del Decreto Ley 4109 de 2011, en el sentido de que el Instituto debe: "[…] actuar como laboratorio nacional de referencia y coordinador de las redes especiales, en el marco del Sistema General de Seguridad Social en Salud […]". El Sistema General de Seguridad Social en Salud, implantado en Colombia por la Ley 100 del 23 de diciembre de 1993 –de la cual fue ponente el entonces senador (como lo es hoy) Álvaro Uribe Vélez–, es un sistema de aseguramiento comercial que convirtió la salud en una mercancía y la atención de la salud en una industria, muy lejos de los principios y fundamentos éticos, morales y deontológicos establecidos hace 2.500 años por Hipócrates de Cos, el padre de la Medicina. La Ley 100 de 1993, mediante la cual se estableció el Sistema General de Seguridad Social en Salud, es la negación de la vocación altruista de la medicina y de la salud pública.

El Decreto Ley debería rezar, por el contrario, que “como instituto científico y técnico, con personería jurídica, autonomía administrativa y patrimonio propio, actuará por fuera del Sistema General de Seguridad Social en Salud”, pues tal como está redactado, pasará con el Instituto lo que ha ocurrido con los hospitales públicos: se han ido a la ruina por el Sistema General de Seguridad Social en Salud y las entidades promotoras de salud (EPS) con su multibillonaria cartera.

Como persona allegada al Instituto, como hijo de Luis Patiño Camargo, que tan cerca estuvo de su trayectoria institucional, hago llegar a su personal –y pido a los colombianos que también lo hagan– un saludo que encuentro difícil de redactar por la admiración que le profeso, porque es gracias a ese dedicado equipo científico y administrativo que el Instituto Nacional de Salud sobrevive y cumple su noble misión en medio de la adversidad económica.

Loor al benemérito Instituto Nacional de Salud en sus 100 años de emblemática existencia.

José Félix Patiño Restrepo

Referencia

1. **Patiño JF.** Un hombre, un instituto. Biomédica. 2011;31(Supl.):13-5.
2. **Restrepo M.** Una visión desde el Consejo Científico-Técnico. En: Toro G, Hernández CA, Raad J, editores. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 1998. p. 19-21.
3. **Sociedad y economía de México.** Diagnóstico de Salud pública en México. Fecha de consulta: 4 de diciembre de 2016. Disponible en: http://sociedadyeconomiademexicojuancwaldo.blogspot.com.co.
4. **Departamento Administrativo de la Función Pública.** Decreto Ley 4109 de 2011 (2 de noviembre). Por el cual se cambia la naturaleza jurídica del Instituto Nacional de Salud - INS y se determina su objeto y estructura. Diario Oficial. 2011; N° 48.241.
5. **Semana.** El Instituto Nacional de Salud incumplió sus obligaciones. Fecha de consulta: 4 de diciembre de 2016. Disponible en: http://www.semana.com/vida-moderna/salud/articulo/el-instituto-nacional-salud-incumplio-obligaciones/103767-3.

Biomédica 2017;37:8-10
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.2906

CASE PRESENTATION

Small cell lung cancer associated with multiple paraneoplastic syndromes

Diana L. Franco[1], Leslie Thomas[2]

[1] Department of Internal Medicine, Mayo Clinic AZ, Scottsdale, United States of America
[2] Division of Nephrology, Mayo Clinic AZ, Scottsdale, United States of America

We report the case of a patient presenting with multiple severe electrolyte disturbances who was subsequently found to have small cell lung cancer. Upon further evaluation, she demonstrated three distinct paraneoplastic processes, including the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone, Fanconi syndrome, and an inappropriate elevation in fibroblast growth factor-23 (FGF23). The patient underwent one round of chemotherapy, but she was found to have progressive disease. After 36 days of hospitalization, the patient made the decision to enter hospice care and later she expired.

Key words: Lung neoplasms; paraneoplastic syndromes; electrolytes; Fanconi syndrome.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.2906

Cáncer de pulmón de células pequeñas asociado a múltiples síndromes paraneoplásicos

Se reporta el caso de una paciente que ingresó al hospital para evaluación de múltiples trastornos electrolíticos y, posteriormente, se le hizo el diagnóstico de cáncer de pulmón de células pequeñas. Tras la evaluación médica, se detectaron tres síndromes paraneoplásicos: síndrome de secreción inadecuada de hormona antidiurética, síndrome de Fanconi y elevación inapropiada del factor 23 de crecimiento de fibroblastos. Se le administró quimioterapia sin éxito, por lo cual se decidió darle tratamiento paliativo y, un tiempo después, falleció.

Palabras clave: neoplasias pulmonares; síndromes paraneoplásicos; electrolitos; síndrome de Fanconi.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.2906

Small cell cancer may be associated with a number of paraneoplastic syndromes, including the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone (SIADH) (1).To our knowledge, only two cases of small cell cancer associated with Fanconi syndrome have been previously reported (2,3). Small cell cancer associated with isolated phosphate wasting without Fanconi syndrome has also been rarely reported, leading some to consider whether fibroblast growth factor 23 (FGF23) played a role in those cases. Despite this speculation, FGF23 level was not measured in these patients.

We present a case of small cell cancer of the lung associated with three discreet paraneoplastic syndromes, including syndrome of inappropriate antidiuresis (SIAD), Fanconi syndrome, and tumor-induced osteomalacia arising from an inappropriate increase in FGF23. This is the third reported case of SCC associated with generalized renal proximal tubule dysfunction (Fanconi syndrome) and the first report of small cell cancer associated with an inappropriately elevated FGF23 hormone level.

Case presentation

A 57-year-old woman with a 35-year smoking history presented with a cough productive of clear sputum, nausea, and decreased oral intake ongoing for one month. Her past medical history included hypertension, hyperlipidemia, chronic obstructive pulmonary disease, obesity, obstructive sleep apnea, and chronic hepatitis B infection. Her family history included leukemia (father), cancer of unknown primary (mother), thyroid cancer (sister), and bladder cancer (brother).

Corresponding author:
Diana L. Franco, 13400 East Shea Blvd., Scottsdale, AZ 85259, United States of America
Phone: (480) 515 6296
franco.diana@mayo.edu

Received: 18/06/15; accepted: 02/06/16

Author's contributions:
Diana L. Franco: study concept and design, acquisition of data, drafting of the manuscript
Leslie Thomas: critical revision of the manuscript for important intellectual content

Investigations

As shown in figure 1, computed tomography of the chest revealed a 3 x 1 cm mass in the posterior bronchus of the right upper lung and right-sided paratracheal and supraclavicular adenopathies. Lymph node biopsy demonstrated a nonhematopoietic malignant neoplasm with strong expression of CD56, consistent with small cell neuroendocrine carcinoma.

Initial laboratory studies revealed multiple electrolyte abnormalities at presentation, including hyponatremia, hypobicarbonatemia, and hypophosphatemia.

Although initially attributed to her anorexia and hypovolemic state, the patient's hypoosmolar hyponatremia (Osm 266 mosmol/kg, Na 123 (135-145 mmol/L) was found to persist despite restoration of euvolemia after several days in the hospital. In the setting of euvolemia and normotension, normal renal clearance (eGFR>60 ml/minute/1.73 m^2), normal thyroid and adrenal studies, adequate solute intake, and absence of renal sodium wasting (fractional excretion of sodium 0.005), the hyponatremic state continued (Na 122 mEq/L) along with increased urine osmolality (Uosm 545 mOsm/kg). This confirmed the presence of SIAD, likely related to the patient's SCC.

A non-anion gap metabolic acidosis (arterial pH: 7.374, pCO_2: 30.5, serum HCO_3-: 16 (22-29 mmol/L)) was also identified. A high urine anion gap (46) was measured, consistent with a renal tubular acidosis. Glucosuria (1.0 mg/dl) in the setting of normal serum glucose (86 [70-100 mg/dl]), generalized aminoaciduria, and hyperphosphaturia in the setting of hypophosphatemia were also observed. These findings were consistent with generalized dysfunction of the renal proximal tubule (i.e., Fanconi syndrome).

In the setting of severe hypophosphatemia and normal estimated glomerular filtration rate (eGFR), FGF23 would be expected to be low. However, an elevation of FGF23 was discovered: 500 RU/ml (reference value: <180 RU/ml). Other phosphaturic hormones were normal, including parathyroid hormone (47 pg/ml; reference: 15-65 pg/ml) and parathyroid hormone-related peptide (<0.2 pmol/L). As expected with an increased level of FGF23, 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)2D) was low (8 pg/ml; reference: 18-78 pg/ml), despite a normal concentration (28 ng/ml; reference: 25-80 ng/ml) of 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) and normal eGFR (>60 ml/minute/1.73 m^2). In this setting, the elevation of FGF23 was inappropriate and consistent with the presence of an independent paraneoplastic process related to SCC.

Treatment

As shown in figure 2, the patient received multiple doses of both oral and intravenous phosphate with minimal overall effect on serum phosphate concentration. The patient's SCC was treated with carboplatin and etoposide.

Outcome and follow-up

Unfortunately, the patient's multiple electrolyte abnormalities did not improve after initial tumor-directed therapy. Follow-up imaging revealed a

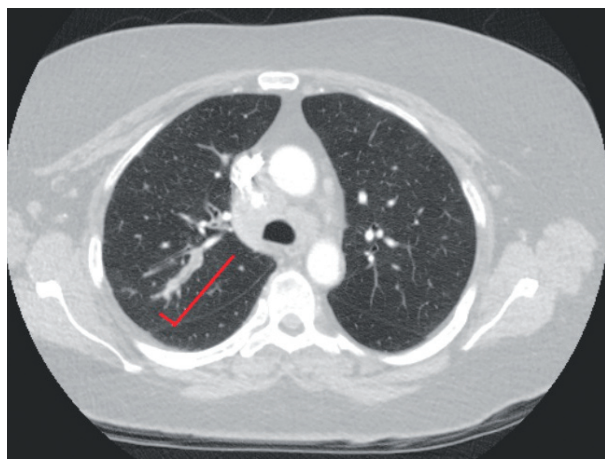


Figure 1. Computed tomography of the chest showing the mass in the right upper lung

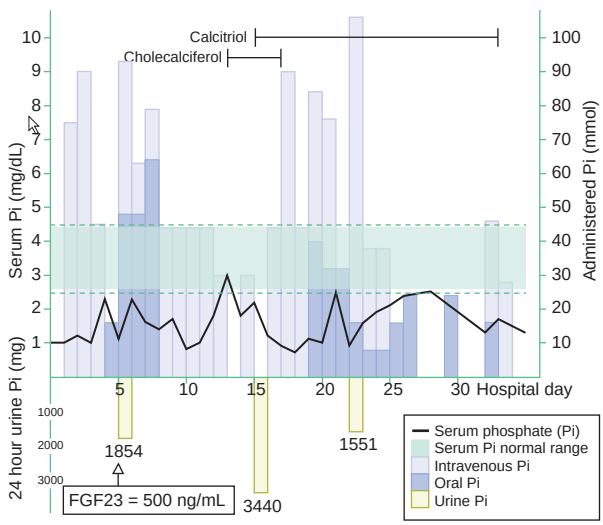


Figure 2. Graph showing the serum and urine phosphate levels with IV and oral phosphate replacements

rapid progression of tumor burden. Subsequently, the patient made the decision to enter hospice care, and she expired.

Discussion

This is the third report of small cell cancer associated with Fanconi syndrome (1,2). One of the two previously reported cases also involved concurrent SIAD.

FGF23 is a hormone produced in osteocytes and osteoblasts that regulates phosphate and vitamin D metabolism. It acts in the proximal tubule by down regulating the expression of luminal sodium-dependent phosphate transporters leading to phosphaturia, and by down-regulating 1a-hydroxylase reducing vitamin D synthesis. It is synthesized as a pro-protein that is cleaved and glycosylated to produce FGF23 fragments (4).

FGF23 is measured by immunometric enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Commercially there are two formats available: The "intact" assay (iFGF23), that recognizes distant epitopes at the cleavage site, and the 'C-terminal' assay (cFGF23), which recognizes two distinct epitopes, in the terminal portion of molecule allowing the measurement of the FGF23 fragments (4,5).

Circulating FGF23 levels are governed chiefly by changes in serum phosphate and by the vitamin D endocrine system. In states of relative hyperphosphatemia or increased production of 1,25(OH)2D, FGF23 concentration rises, promoting renal phosphate wasting and inhibition of 1a-hydroxylase with subsequent attenuation of serum phosphate and 1,25(OH)2D levels. In the condition of tumor-induced osteomalacia, unregulated phosphatonin (e.g., FGF23) production leads to hyperphosphaturia, low circulating levels of 1,25(OH)2D, severe hypophosphatemia, and, eventually, osteomalacia. In this case, neither osteomalacia nor symptoms of osteomalacia were noted. Most documented cases of tumor-induced osteomalacia have involved benign mesenchymal tumors, specifically solitary, non-aggressive appearing soft tissue or osseous lesions (6). However, there are cases in which infiltrating aggressive tumors are seen (7).In a recent review of patients with small cell cancer with apparent tumor-related disturbances of phosphate metabolism, six patients demonstrated isolated renal phosphate wasting without Fanconi syndrome and two demonstrated oncogenic osteomalacia (3). Of those cases, three had concurrent SIADH, one had concurrent Cushing's syndrome, and one had both concurrent SIADH and Cushing's syndrome. In none of those cases was FGF23 measured. In this patient, hypophosphatemia was promoted by two independent processes: Generalized proximal tubular dysfunction and an inappropriately elevated FGF23.

Conclusions

Small cell cancer may be associated with a variety of paraneoplastic syndromes, including rarely encountered processes such as Fanconi syndrome and tumor-induced osteomalacia. Restoration of serum phosphate to normal levels in individuals with small cell cancer-associated Fanconi syndrome or tumor-induced osteomalacia may prove difficult despite aggressive oral and intravenous phosphate replacement. FGF23 should be measured in any patient with difficulties to manage hypophosphatemia and hyperphosphaturia.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Financial support

The authors declare not receiving any type of financial aid for the creation of the present manuscript.

References

1. **Orr LE.** Fanconi syndrome and oat cell carcinoma of the lung. West J Med. 1980;133:250-1.
2. **Breton JL, Dalphin JC, Depierre A, Wendling D.** Fanconi syndrome and small cell anaplastic bronchial cancer. Ann Med Interne (Paris). 1987;138:554.
3. **Tantisattamo E, Ng RC.** Dual paraneoplastic syndromes: Small cell lung carcinoma-related oncogenic osteomalacia, and syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion: Report of a case and review of the literature. Hawaii Med J. 2011;70:139-43.
4. **Smith ER, McMahon LP, Holt SG.** Fibroblast growth factor 23. Ann Clin Biochem. 2014;51:203-27. http://dx.doi.org/10.1177/0004563213510708
5. **Jonsson KB, Zahradnik R, Larsson T, White KE, Sugimoto T, Imanishi Y, *et al*.** Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia. N Engl J Med. 2003;348:1656-63. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa020881
6. **Dadoniene J, Miglinas M, Miltiniene D, Vajauskas D, Seinin D, Butenas P, *et al*.** Tumour-induced osteomalacia: A literature review and a case report. World J Surg Oncol. 2016;14:4. http://dx.doi.org/10.1186/s12957-015-0763-7
7. **Higley M, Beckett B, Schmahmann S, Dacey E, Foss E.** Locally aggressive and multifocal phosphaturic mesenchymal tumors: Two unusual cases of tumor-induced osteomalacia. Skeletal Radiol. 2015;44:1825-31. http://dx.doi.org/10.1007/s00256-015-2246-x.

Biomédica 2017;37:11-21
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.2995

ARTÍCULO ORIGINAL

Síntesis de nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con antibióticos y su actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Mónica Tatiana Herrera[1], Jhon Jhamilton Artunduaga[2],
Claudia Cristina Ortiz[2], Rodrigo Gonzalo Torres[1]

[1] Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia
[2] Escuela de Microbiología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Introducción. Las nanopartículas poliméricas constituyen una herramienta nanotecnológica que podría ayudar a combatir los microorganismos patógenos que han desarrollado resistencia a los antibióticos convencionales.
Objetivo. Sintetizar nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con ofloxacina y vancomicina, y determinar su actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM).
Materiales y métodos. Las nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con ofloxacina y vancomicina se sintetizaron utilizando el método de emulsión y evaporación de solvente. Se caracterizaron mediante dispersión de luz en modo dinámico, electroforesis Doppler con láser y microscopía electrónica de barrido (S-TEM). Se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de las nanopartículas de ácido poliláctico con ofloxacina contra *E. coli* O157:H7 y nanopartículas de ácido poliláctico con vancomicina contra SARM, mediante el método de microdilución en caldo.
Resultados. Se obtuvieron nanopartículas poliméricas con tamaños inferiores a 379 nm y carga superficial positiva de hasta 21 mV. Las nanopartículas cargadas con ofloxacina presentaron una concentración inhibitoria mínima (CIM_{50}) de 0,001 µg/ml frente a *E. coli* O157:H7, valor 40 veces menor que la concentración de antibiótico libre necesaria para lograr el mismo efecto (CIM_{50}=0,04 µg/ml). Para SARM, las nanopartículas mejoraron la potencia farmacológica *in vitro* de la vancomicina al exhibir una MIC_{50} de 0,005 µg/ml, comparada con la de 0,5 µg/ml del antibiótico libre.
Conclusiones. Se mejoró el efecto antibacteriano de la ofloxacina y la vancomicina incorporadas en la matriz polimérica de ácido poliláctico. Las nanopartículas poliméricas constituirían una alternativa para el control de cepas bacterianas de interés en salud pública.

Palabras clave: *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina; nanopartículas: antibacterianos.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.2995

Synthesis of antibiotic loaded polylactic acid nanoparticles and their antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Introduction: Polymeric nanoparticles are promising nanotechnology tools to fight pathogenic bacteria resistant to conventional antibiotics.
Objective: To synthesize polylactic acid nanoparticles loaded with ofloxacin and vancomycin, and to determine their antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).
Materials and methods: We synthesized ofloxacin or vancomycin loaded polylactic acid nanoparticles by the emulsification-solvent evaporation method, and characterized them by dynamic light scattering, laser Doppler electrophoresis and scanning electron microscopy. We evaluated *in vitro* antibacterial activity of ofloxacin- and vancomycin-loaded polylactic acid nanoparticles against *E. coli* O157:H7 and MRSA using the broth microdilution method.
Results: Ofloxacin- and vancomycin-loaded polylactic acid nanoparticles registered a positive surface charge density of 21 mV and an average size lower than 379 nm. *In vitro* minimum inhibitory concentration

Contribución de los autores:
Mónica Tatiana Herrera: fase experimental y discusión de resultados
Jhon Jhamilton Artunduaga: asesoría de ensayos microbiológicos
Claudia Cristina Ortiz y Rodrigo Gonzalo Torres: concepción de la idea de investigación
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

(MIC_{50}) of ofloxacin-polylactic acid nanoparticles was 0,001 µg/ml against *E. coli* O157:H7, i.e., 40 times lower than the free ofloxacin (MIC_{50}: 0.04 µg/ml), indicating enhanced antibacterial activity while the *in vitro* MIC_{50} of vancomycin-polylactic acid nanoparticles was 0,005 µg/ml against MRSA, i.e., 100 times lower than that of free vancomycin (MIC_{50}: 0.5 µg/ml).
Conclusion: Polylactic acid nanoparticles loaded with ofloxacin and vancomycin showed a higher antibacterial activity. Polymeric nanoparticles are a possible alternative for drug design against pathogenic bacterial strains of public health interest.

Key words: *Escherichia coli*; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; nanoparticles: antibacterial agents.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.2995

Escherichia coli y *Staphylococcus aureus* constituyen especies bacterianas relevantes en salud pública debido a la alta prevalencia y complejidad de las enfermedades que causan (1), así como por su capacidad para desarrollar resistencia a los antibióticos (2). Las infecciones ocasionadas por la cepa enterohemorrágica de *E. coli* O157:H7 producen complicaciones gastrointestinales que ocasionalmente conducen al síndrome urémico hemolítico, principalmente en la población infantil. El cuadro clínico se caracteriza por trombocitopenia, deficiencia renal y anemia (3).

El primer brote epidémico causado por *E. coli* O157:H7 se registró en Estados Unidos en 1982 debido al consumo de hamburguesas contaminadas con este agente, lo cual produjo diarrea con sangre y dolor abdominal grave entre las personas afectadas (4). En la década de los noventa, también se presentaron brotes en Canadá, Reino Unido, Bélgica, Irlanda, África y Nueva Zelanda (5-8). Dos de los mayores brotes se han registrado en Japón e Inglaterra. En 1996, en un comedor escolar de Japón, se diagnosticaron 7.966 casos, en 106 de los cuales se presentó el síndrome urémico hemolítico (9). Asimismo, en el brote en Inglaterra en el 2009, hubo 95 personas afectadas, 17 de las cuales desarrollaron un cuadro clínico más grave con deficiencia renal y anemia (10).

En Suramérica hay menos información sobre los brotes causados por *E. coli* O157:H7 debido a la falta de un sistema riguroso de vigilancia epidemiológica para este agente. No obstante, Argentina es uno de los países con mayor número de casos de niños con diarrea con sangre (alrededor de 7 %) asociados a infecciones con esta cepa bacteriana (11). Del mismo modo, en algunas investigaciones en Colombia se ha encontrado una prevalencia de 4,7 % en niños afectados por *E. coli* O157:H7 causante de diarrea. Recientemente, esta condición ha sido categorizada como “enfermedad humana en progreso” por los organismos de vigilancia (12).

En cuanto a *S. aureus*, desde los años sesenta se han venido identificando cepas con resistencia a los antibióticos betalactámicos, como la penicilina y la meticilina causantes de infecciones, principalmente en hospitales. Las cepas de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) son responsables de enfermedades graves como la sepsis y la neumonía necrosante (13,14). La enfermedad infecciosa causada por SARM puede ser letal en pacientes inmunosuprimidos que se hayan contagiado mediante el contacto directo con un individuo portador o con dispositivos médicos contaminados, lo cual contribuye en gran medida a la colonización e invasión bacteriana (15).

En 1999, la causa de más de 25 % de las enfermedades registradas en Europa fue SARM (16), especialmente en Italia, con una incidencia de 35 % (17). Asimismo, 25 % de las enfermedades registradas en Estados Unidos se atribuyeron a cepas de *S. aureus* resistente a los antibióticos betalactámicos (18). En Latinoamérica ha habido un continuo incremento de las enfermedades infecciosas asociadas a SARM. Así, en el 2004, la prevalencia de *S. aureus* como agente infeccioso fue de 80 a 82 % en Perú y Chile, en tanto que en México fue de 52 %, en Colombia de 47 %, en Argentina de 42 % y en Venezuela de 25 % (19-21).

Hoy en día, los tratamientos disponibles para combatir las enfermedades infecciosas causadas por *E. coli* O157:H7 se centran en el uso de antibióticos del tipo de las quinolonas, por ejemplo, la ofloxacina, y en las causadas por SARM, se

Correspondencia:
Claudia Cristina Ortiz, Laboratorio de Bioquímica y Microbiología, Escuela de Microbiología, Universidad Industrial de Santander, Calle 9 Carrera 27, Edificio Camilo Torres, laboratorio 202, Bucaramanga, Colombia
Teléfono: (577) 634 4000, extensión 3404-1529
ortizc@uis.edu.co

Recibido: 04/08/15; aceptado: 16/05/16

emplean los glucopéptidos, como la vancomicina. A pesar de que ya hay cepas resistentes a estos antibióticos, se continúan prescribiendo para afecciones causadas por cepas sensibles, aunque desencadenan efectos secundarios (cefalea, anemia, trombocitopenia, diarrea) y, además, se sabe que son poco eficaces, principalmente por su baja solubilidad y la dificultad para llegar hasta su blanco terapéutico (13,22-24).

De allí la necesidad de alternativas que permitan contrarrestar las infecciones bacterianas causadas por *E. coli* O157:H7 y SARM. Una de las opciones promisorias para mejorar la eficacia y la biodisponibilidad de los antibióticos convencionales es su incorporación en polímeros biodegradables. Los antibióticos incorporados en una partícula polimérica de tamaño nanométrico tienen mejor solubilidad, distribución en los tejidos y penetración celular, con menor citotoxicidad y efectos secundarios, entre otras ventajas (1,24,25).

Las investigaciones en nanotecnología sobre el transporte de compuestos biológicamente activos hacia sitios de interés han resultado en el desarrollo de sistemas nanoestructurados con fines terapéuticos, como las nanopartículas poliméricas (26). Los polímeros biodegradables más empleados para la síntesis de nanopartículas han sido el ácido poliláctico y el ácido poliláctico coglicólico (*polylactic-co-glycolic acid,* PLGA) debido a que son materiales biocompatibles y presentan una liberación controlada del principio activo. Además, han sido aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para la elaboración de sistemas de liberación de fármacos y otros usos biomédicos (27,28).

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue sintetizar y caracterizar nanopartículas de ácido poliláctico (PLA) cargadas con ofloxacina (PLA-ofloxacina) y vancomicina (PLA-vancomicina) según su tamaño, forma, carga superficial neta y concentración de antibiótico en el polímero. Además, se determinó la actividad bacteriostática y bactericida *in vitro* de la ofloxacina y la vancomicina en ácido poliláctico frente a *E. coli* O157:H7 y SARM, respectivamente.

Materiales y métodos

Reactivos y cepas bacterianas

El ácido poliláctico (con peso molecular, PM, de 85 a 160 kDa), la ofloxacina (OFLX, PM: 361,37 g/mol), la vancomicina (VCM, PM: 1485,71 g/mol), el poloxámero 407 (PM: 12,5 kDa) y la polietilenimina (PM: 2 kDa) se adquirieron de Sigma-Aldrich. El acetonitrilo de máximo grado de pureza (*High Purity Liquid Chromatoghaphy*, HPLC) y el metanol en grado HPLC (MetOH) se obtuvieron de J.T. Baker. El diclorometano y el medio de cultivo de Mueller-Hinton (MH) se adquirieron de Merck. El medio de cultivo de infusión de cerebro y corazón (*Brain Heart Infusion*, BHI) se obtuvo de Oxoid. La cepa *E. coli* O157:H7 fue donada por la Escuela de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana y la cepa de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) fue donada por la Escuela de Microbiología de la Universidad Industrial de Santander. Las dos cepas bacterianas se mantuvieron en medio de cultivo BHI.

Síntesis de nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con ofloxacina

Las nanopartículas de ofloxacina en ácido poliláctico se sintetizaron mediante el método de emulsión y evaporación de solvente descrito por Jeffery, *et al*. (29,30). Inicialmente, se preparó una solución de ofloxacina en ácido poliláctico en una relación de 1 a 5 en diclorometano. Esta primera solución se homogeneizó en un vórtex a 300 rpm durante 20 minutos y se la agregó a una fase acuosa formada por un agente estabilizante, el poloxámero (0,5 % p/v), y un agente catiónico, la polietilenimina (0,0025 % p/v). Posteriormente, la mezcla se homogeneizó utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax® (IKA) a 15.500 rpm durante cinco minutos. El solvente orgánico se evaporó a presión de 120 mbar a 23 °C en un rotoevaporador Heidolph. Las nanopartículas se purificaron mediante centrifugación a 6.000 rpm durante 20 minutos, y se lavaron con agua desionizada. La emulsión blanquecina obtenida se almacenó bajo refrigeración a una temperatura entre 4 y 8 °C.

Síntesis de nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con vancomicina

Las nanopartículas de vancomicina en ácido poliláctico se sintetizaron según el método de doble emulsión y evaporación de solvente (31-33). Se preparó la primera emulsión de vancomicina en ácido poliláctico, usando diclorometano con una relación de medicamento y polímero de 1 a 5, y esta emulsión se añadió a la fase acuosa que contenía el poloxámero (0,5 % p/v) y la polietilenimina (0,0025 % p/v). Estas dos fases se sometieron a emulsión utilizando el homogeneizador Ultra-Turrax® (IKA). El diclorometano se evaporó a presión reducida y las nanopartículas de vancomicina

en ácido poliláctico se purificaron mediante centrifugación y posteriormente se lavaron con agua desionizada. La emulsión final fue almacenada bajo refrigeración a temperaturas entre 4 y 8 °C.

Caracterización de las nanopartículas poliméricas

Se caracterizó el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas mediante dispersión de luz dinámica. La carga superficial se determinó mediante el potencial zeta, utilizando un equipo Malvern Zetasizer Nano Series Nano-zs90, equipado con un láser operado a 633 nm, 25 °C y un ángulo de dispersión fijo de 90°. Las muestras se diluyeron diez veces con agua desionizada y cada medición se hizo por triplicado. También, se empleó la técnica de microscopía electrónica de barrido para determinar la morfología y el tamaño de las nanopartículas. Para ello, se usó el microscopio FEI Quanta 650 del Laboratorio de Microscopía del Parque Tecnológico de la Universidad Industrial de Santander. La concentración de antibiótico se determinó utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC).

Determinación de la concentración del antibiótico cargado en las nanopartículas de ácido poliláctico

Para determinar la cantidad de ofloxacina o vancomicina cargada en la matriz polimérica, las nanopartículas se centrifugaron durante 40 minutos a 12.000 rpm. El precipitado se disolvió en 1 ml de diclorometano, se añadieron 4 ml de solución tampón fosfato (pH 3) y se agitó durante 20 minutos con el fin de extraer el antibiótico de la solución tampón a partir de la solución orgánica. Después de separar las dos fases mediante decantación durante 30 minutos, la solución tampón se filtró y la concentración del medicamento se determinó mediante HPLC (34,35).

Determinación de la concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima

La actividad antibacteriana se evaluó mediante la metodología de microdilución en caldo (36,37). Inicialmente, se prepararon el preinóculo de *E. coli* O157:H7 en caldo de Luria-Bertani (LB) y el de SARM en caldo de Muller-Hilton (MH) durante 12 a 14 horas a 37 °C y a 200 rpm. El inóculo final para cada cepa se ajustó a la escala 0,5 de McFarland (10^8 UFC/ml). La cinética de crecimiento de cada microorganismo se determinó mezclando una parte de suspensión bacteriana con una parte de suspensión de nanopartículas en diferentes concentraciones, utilizando los 96 pozos de microplacas de la prueba ELISA, y se incubaron a 37 °C en agitación orbital a 200 rpm durante ocho horas. Se tomaron muestras cada hora y se analizaron en un espectrofotómetro lector de microplaca ELISA (Bio Rad, iMarck™) a 595 nm. Los ensayos se hicieron por triplicado con los respectivos controles de esterilidad del medio de cultivo (éste únicamente), el control de antibiótico (en ausencia de nanopartículas) y el control de crecimiento para cada bacteria (medio de cultivo más inóculo bacteriano). Las concentraciones inhibitorias mínimas de 50 % (CIM_{50}) y de 90 % (CIM_{90}) se definieron como la menor concentración del nanomaterial capaz de reducir la concentración bacteriana en un 50 y 90 %, respectivamente, en relación con el control de crecimiento y en ausencia de los inhibidores. Asimismo, se evaluó la actividad antibacteriana de los polímeros empleados en la síntesis de las nanopartículas (polietilenimina 0,00 25 % p/v y poloxámero 0,5 % p/v).

Para determinar la concentración bactericida mínima (CBM), se tomaron alícuotas 100 µl a partir de la CIM_{50} determinada para cada bacteria, y para las concentraciones de nanopartículas cargadas con medicamento en las cuales no se evidenció crecimiento, se tomó una alícuota de 100 µl que se agregó a 900 µl de caldo de cultivo BHI, con el fin de revitalizar las células bacterianas existentes. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Los cultivos líquidos obtenidos se sembraron en superficies utilizando agar BHI en cajas de Petri durante 24 horas a 37 °C, con el fin de corroborar la ausencia de crecimiento bacteriano. Se definió la CBM como la menor concentración de nanopartículas que produjo una reducción de unidades formadoras de colonias (UFC) mayor de 99,9 % en comparación con el inóculo sin tratamiento.

Resultados

Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de ofloxacina y vancomicina en ácido poliláctico

Las nanopartículas poliméricas obtenidas se caracterizaron mediante dispersión de luz dinámica, electroforesis Doppler con láser y microscopía electrónica de barrido (S-TEM) (figuras 1 y 2). El análisis mediante dispersión de luz dinámica (figuras 1A y 2A) y electroforesis Doppler con láser (figura 1B y 2B), evidenció la obtención de nanopartículas de tamaños hidrodinámicos de 348 a 379 nm y carga superficial máxima de +21 mV. La carga positiva de las nanopartículas se debió

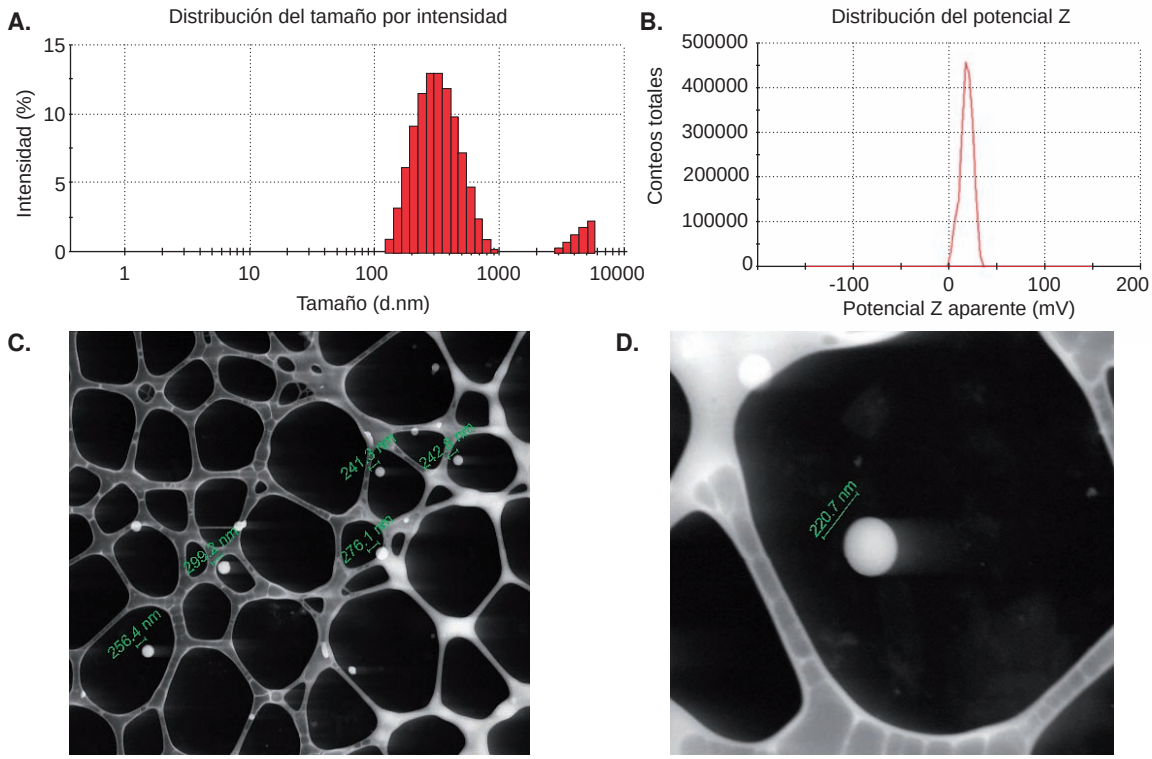


Figura 1. Caracterización de nanopartículas de ofloxacina en ácido poliláctico. **A.** Dispersión de luz dinámica. **B.** Potencial zeta. **C.** y **D.** Imágenes en microscopía electrónica de barrido (S-TEM)

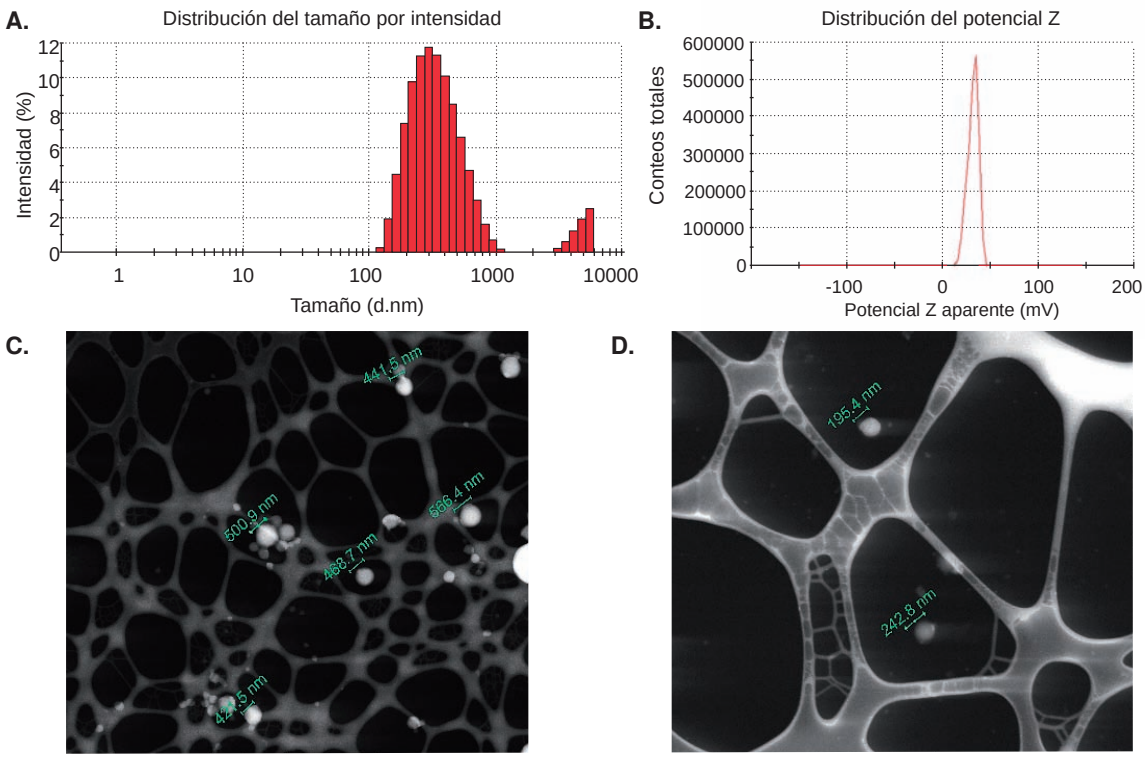


Figura 2. Caracterización de nanopartículas de vancomicina en ácido poliláctico. **A.** Dispersión de luz dinámica. **B.** Potencial zeta. **C.** y **D.** Imágenes en microscopía electrónica de barrido (S-TEM)

a la presencia del agente catiónico polietilenimina, el cual también estabilizó la emulsión mediante repulsiones electrostáticas. Los tamaños menores de 379 nm y la carga superficial de las nanopartículas obtenidas fueron comparables e, incluso, mejores que las obtenidas por otros autores (38,39). En las microfotografías S-TEM se evidencian las nanopartículas monodispersas, sin agregados y de morfología esférica (figuras 1, C-D y 2, C-D). En el cuadro 1 se presenta un resumen de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con los medicamentos.

Determinación de la concentración del antibiótico cargado en las nanopartículas

Mediante HPLC en fase inversa se determinó una concentración de la vancomicina en las nanopartículas de ácido poliláctico de 0,090 µg del medicamento por mg de polímero. Para la ofloxacina, se obtuvo una mayor concentración, de 0,73 µg de medicamento por mg de polímero (cuadro 1).

Actividad antibacteriana de las nanopartículas de ácido poliláctico cargadas con antibióticos

En las figuras 3 y 4 se presentan la CIM_{50}, la CIM_{90} y la CBM de la ofloxacina y la vancomicina en ácido poliláctico, y de los medicamentos libres para las cepas patógenas estudiadas. Las nanopartículas de ofloxacina en ácido poliláctico inhibieron el 50 % de las células de *E. coli* O157:H7 en una concentración de 0,001 µg/ml, concentración 40 veces menor que la requerida por el antibiótico libre (CIM_{50}=0,04 µg/ml). En cuanto a SARM, la CIM_{50} obtenida de las nanopartículas de vancomicina en ácido poliláctico fue de 0,005 µg/ml, la cual es 100 veces menor que la necesaria para que el antibiótico libre alcance el mismo efecto de inhibición (CIM_{50}=0,5 µg/ml). En el cuadro 2 se presenta el resumen de todos los resultados de actividad antibacteriana obtenidos. Los polímeros empleados en la síntesis de las nanopartículas, polietilenimina (0,0025 % p/v) y poloxámero 407 (0,5 % p/v), no tuvieron ningún efecto inhibitorio contra *E. coli* O157:H7 y SARM.

Discusión

Uno de los objetivos del empleo de nanopartículas poliméricas como dispositivos de entrega de medicamentos es optimizar su eficacia terapéutica. Se ha demostrado que los sistemas nanoestructurados son una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas; por ejemplo, las nanopartículas de rifampicina en alginato mejoraron la eficacia del medicamento contra *Mycobacterium turberculosis*, las nanoesferas de anfotericina en policaprolactona contra *Candida albicans* disminuyeron la toxicidad *in vivo* de la anfotericina, y las nanopartículas de ciprofloxacina en poliacrilato 'glicosilado' contra *S. aureus* mejoraron la biodisponibilidad de la ciprofloxacina (24).

En cuanto a los medicamentos de naturaleza hidrofóbica, el principal método empleado para la síntesis de nanopartículas poliméricas es el de emulsión y evaporación del solvente (13,40,41). Utilizando este método, las nanopartículas de ofloxacina en ácido poliláctico presentaron forma esférica y un tamaño promedio de 379 nm (figura 1, cuadro 1). Un posible mecanismo de formación de las nanopartículas poliméricas es la progresiva disminución del tamaño de las gotas de emulsión durante la evaporación del solvente (en este caso, diclorometano), hasta la obtención de las nanopartículas que se estabilizan debido a la presencia de agentes como la gelatina, el polivinilalcohol o los poloxámeros (42-44).

En este estudio se usó poloxámero 407 como agente emulsionante, el cual estabiliza las nanopartículas al absorberse en la superficie de las partículas formadas mediante interacciones hidrofóbicas por medio del bloque de óxido de polipropileno y el bloque hidrofílico (óxido de polietileno), los cuales se extienden hacia el medio acuoso. De esta manera, se forma una capa hidrofílica que estabiliza las nanopartículas de ácido poliláctico (45).

Algunos autores han empleado la técnica de emulsión y evaporación del solvente para encapsular medicamentos hidrofóbicos y han obtenido tamaños entre 0,2 y 8 µm (46,47). Sin embargo, son pocos los estudios en los cuales se ha implementado para la encapsulación de ofloxacina; por ejemplo, Abazinge, *et al.*, obtuvieron partículas entre 37 µm y 425 µm (38); Cheow, *et al.*, prepararon nanopartículas de alrededor de 360 nm (48), tamaños comparables con los obtenidos en este trabajo (<379 nm) (cuadro 1).

Por otro lado, las nanopartículas de vancomicina en ácido poliláctico sintetizadas mediante el método de doble emulsión y evaporación del solvente, también se estabilizaron empleando poloxámero (49). Se ha descrito que la formación de las nanopartículas mediante esta técnica, se presenta en el momento de evaporación del solvente orgánico, proceso mediante el cual se acelera la precipitación del polímero atrapando el principio activo (antibiótico) y formando las partículas nanométricas (31). Algunos autores han obtenido

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de antibiótico en ácido poliláctico

Sistema nanoestructurado	Tamaño (nm)	Índice de polidispersión (PdI)	Potencial zeta (mV)	µg de antibiótico por mg de ácido poliláctico
Ofloxacina en ácido poliláctico	379,3±3,372	0,335±0,004	+ 16,4±3,70	0,730±5,4
Vancomicina en ácido poliláctico	348,2±8,869	0,299±0,002	+ 21,6±3,70	0,090±7,3

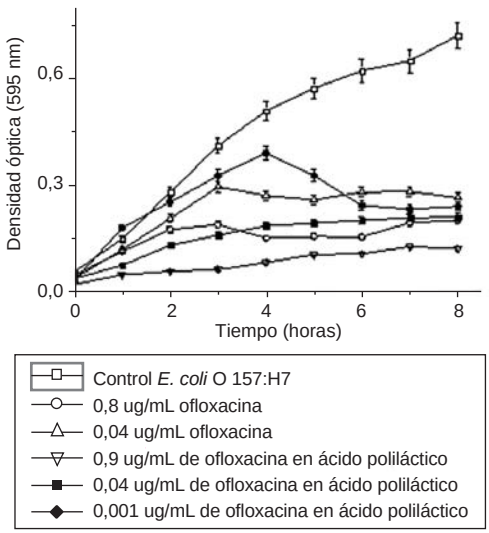


Figura 3. Actividad antibacteriana de ofloxacina libre y nanopartículas de ofloxacina en ácido poliláctico frente a *E. coli* O157:H7 (ofloxacina libre, CIM_{50}=0,04 µg/ml, CIM_{90}>3,2 µg/ml; nanopartículas de ofloxacina en ácido poliláctico, CIM_{50}=0,001 µg/ml, CIM_{90}>0,9 µg/ml). Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

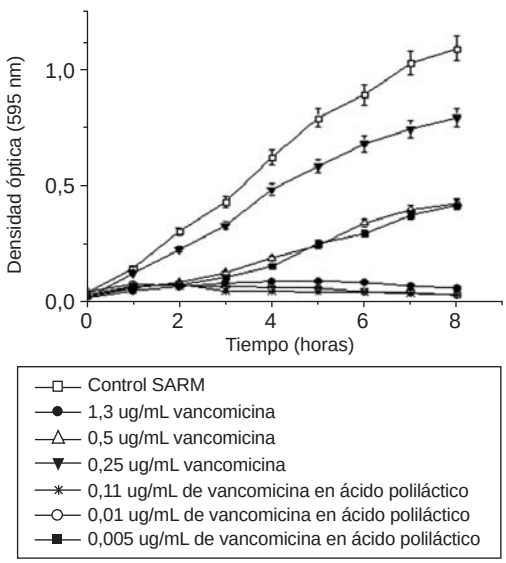


Figura 4. Actividad antibacteriana de vancomicina libre y nanopartículas de vancomicina en ácido poliláctico frente a SARM (vancomicina libre, CIM_{50}>0,5 µg/ml, CIM_{90}=1,3 µg/ml; nanopartículas de vancomicina en ácido poliláctico, CIM_{50}=0,005 µg/ml, CIM_{90}: 0,01 µg/ml). Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

nanopartículas y micropartículas poliméricas cargadas con vancomicina con tamaños entre 466 nm y 11,8 µm (33,50). Sin embargo, en este trabajo se obtuvieron nanopartículas esféricas con un tamaño promedio de 348 nm, resultados comparables e incluso mejores que los obtenidos en las investigaciones antes mencionadas.

Se considera que la técnica más adecuada para la preparación de nanopartículas de vancomicina en ácido poliláctico y para la encapsulación de otras moléculas hidrosolubles como péptidos, proteínas y vacunas, es el método de síntesis de doble emulsión agua-aceite-agua (*water-oil-water,* W/O/W) y evaporación del solvente (51,52). Con esta técnica se han encapsulado diferentes sustancias de carácter hidrofílico, como la albúmina de suero bovino (35), así como la insulina y la lisozima (53), y los tamaños obtenidos fluctuaron entre 200 nm y 1.200 nm (39).

Con respecto a la concentración de la vancomicina en nanopartículas de ácido poliláctico (0,09 µg de vancomicina por mg de ácido), esta fue suficiente para evaluar el efecto antibacteriano. Sin embargo, fue difícil alcanzar una concentración mayor del medicamento, porque en la mayoría de moléculas hidrofílicas se presenta una rápida difusión en la fase acuosa durante la emulsión (54-56). La liberación rápida de vancomicina en ácido poliláctico se ve favorecida durante el proceso de evaporación del solvente, pues la sustancia encapsulada puede liberarse en la fase acuosa a través de poros presentes en las nanopartículas (31,39). Además, la baja concentración de antibiótico encapsulado podría deberse a la localización del medicamento en la superficie de las nanopartículas (57), el cual se elimina en el momento de la purificación (41).

Es importante mencionar que la cantidad de medicamento incorporada en el polímero depende de las interacciones entre este y la presencia de grupos funcionales como los ésteres o los carboxilos (58). En este contexto, para las nanopartículas de ofloxacina en ácido poliláctico se obtuvo una mayor concentración de antibiótico (0,73 µg de medicamento por mg de polímero), probablemente debido a una mayor interacción electrostática entre

Cuadro 2. Actividad antibacteriana de compuestos contra *E. coli* O157:H7 y SARM

Cepa bacteriana	Compuesto	CIM_{50} (µg/ml)	CIM_{90} (µg/ml)	CBM (µg/ml)
E. coli O157:H7	Ofloxacina	0,040	>3,2	>3,2
	Ofloxacina en ácido poliláctico	0,0010	0,90	>0,90
SARM	Vancomicina	0,50	1,3	>2,0
	Vancomicina en ácido poliláctico	0,0050	0,010	>0,10

CIM_{50}: concentración inhibitoria mínima de 50 %; CIM_{90}: concentración inhibitoria mínima de 90 %; CBM: concentración bactericida mínima. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

las cargas negativas de los grupos carboxilos terminales del ácido poliláctico (59) y las cargas positivas generadas en el nitrógeno de la piperazina presente en la ofloxacina (con valores de pH inferiores a pKa_1<6,08) (60).

Por otra parte, en los últimos años se ha demostrado una mayor eficacia de los antibióticos al estar incorporados en las nanopartículas poliméricas (25,61). En este trabajo, las nanopartículas de ofloxacina en ácido poliláctico como agente antibacteriano contra *E. coli* O157:H7 exhibieron un efecto 40 veces mayor que la CIM_{50} del antibiótico libre (cuadro 2 y figura 3). El aumento de la actividad antibacteriana *in vitro* puede haberse debido a una mayor interacción entre la superficie de las nanopartículas y la membrana biológica (62). El aumento en la capacidad inhibitoria de la ofloxacina y de otras fluoroquinolonas ha sido objeto de las investigaciones de Jeong, *et al.*, quienes determinaron un incremento del 30 % en el efecto antibacteriano de la ciprofloxacina encapsulada en PLGA contra *E. coli* (63). De igual manera, se encontró que la ofloxacina encapsulada en liposomas aumentó dos veces la inhibición (CIM=0,0525 µg/ml) contra *E.coli* ATCC 25922, en comparación con el medicamento libre (CIM=0,12 µg/ml) (62). También, se evidenció la potencialización del efecto inhibitorio contra *E. coli* ATCC 35218 en más de 200 veces al emplear nanopartículas de ofloxacina en polietilencianoacrilato (CIM=0,0005 µg/ml), en comparación con la ofloxacina (CIM=0,12 µg/ml) (64).

Cabe destacar que se han hecho pocos estudios empleando nanopartículas poliméricas de vancomicina contra SARM. En algunas investigaciones se ha observado una disminución de la eficacia antibacteriana contra *S. aureus* de la vancomicina en nanopartículas de ácido PLGA y polietilenglicol (CIM=128 µg/ml), en comparación con el antibiótico libre (CIM=32 µg/ml) (33). En otros casos, se ha reportado un aumento en la eficacia del medicamento al conjugarlo con vancomicina en nanopartículas de quitosano, cuya CIM contra *S. aureus* resistente a vancomicina disminuyó hasta 97 % (65). Resultados similares se encontraron al usar nanopartículas de vancomicina conjugadas con oro y probadas frente a SARM, con una CIM_{50} de 8 µg/ml, en comparación con los 64 µg/ml de la vancomicina libre (66). En esta investigación, el uso de nanopartículas de vancomicina en ácido poliláctico redujo la CIM_{50} contra SARM hasta en 100 veces comparada con la del antibiótico libre (cuadro 2; figura 4). En este caso, la mayor actividad antibacteriana de la vancomicina cargada en nanopartículas de ácido poliláctico se debió, posiblemente, a una mayor biodisponibilidad y entrega del medicamento (61). Asimismo, el incremento en la potencia del antibiótico puede responder a la penetración de las nanopartículas poliméricas de vancomicina en la membrana celular (65).

La actividad de los antibióticos mejoró ostensiblemente cuando se incorporaron en la matriz polimérica del ácido poliláctico. Los controles de polietilenimina y de poloxámero 407 en las concentraciones empleadas en la síntesis (0,0025 % p/v y 0,5 % p/v, respectivamente), no tuvieron ningún efecto inhibitorio contra *E. coli* O157:H7 y SARM. Una de las principales características de las nanopartículas sintetizadas favorable para la actividad antibacteriana es la carga superficial positiva por la presencia de polietilenimina (67) (cuadro 1). Se ha comprobado que la carga positiva en la superficie de las nanopartículas es un parámetro importante en el anclaje inicial sobre la superficie bacteriana, ya que genera uniones electrostáticas con la superficie negativa de las bacterias (68,69). Debe recordarse que la superficie de las bacterias Gram negativas y Gram positivas presenta una carga neta negativa, ya sea por la presencia de ácidos lipoteicoicos o ácidos teicoicos, o por los lipopolisacáridos y fosfolípidos que conforman la estructura celular (25,58).

Los resultados del presente trabajo demostraron que características tales como un tamaño inferior a 380 nm y la carga superficial positiva de las nanopartículas de ácido poliláctico, mejoraron la potencia farmacológica de los medicamentos contra

E. coli O157:H7 y SARM, por lo cual se plantean como una importante alternativa en la inhibición del crecimiento de este tipo de cepas patógenas multirresistentes. Además, es importante destacar que no se han publicado otros estudios sobre el tipo de nanoestructuras sintetizadas empleadas en este trabajo, por lo cual estos resultados constituyen una base para continuar el desarrollo de sistemas de entrega de medicamentos en nanopartículas de ácido poliláctico.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan no haber tenido ningún conflicto de intereses.

Financiación

La presente investigación fue financiada por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander y por Colciencias (Código de proyecto: 1102-5453-1674).

Referencias

1. **Turos E, Reddy GS, Greenhalgh K, Ramaraju P, Abeylath SC, Jang S, *et al*.** Penicillin-bound polyacrylate nanoparticles: Restoring the activity of β-lactam antibiotics against MRSA. Bioorg Med Chem. 2007;17:3468-72. http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.03.077

2. **Sharpe JN, Shively EH, Polk HC.** Clinical and economic outcomes of oral linezolid versus intravenous vancomycin in the treatment of MRSA-complicated, lower-extremity skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am J Surg. 2005;189:425-8. http://dx.doi.org/10.1016/j.amjsurg.2005.01.011

3. **Wong C, Jelacic S, Habeeb R, Watkins S, Tarr P.** The risk of the hemolytic–uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia c*oli O157:H7 infections. N Engl J Med. 2000;342:1930-6. http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200006293422601

4. **Besser RE, Griffin PM, Slutsker L.** *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome: An emerging infectious disease. Annu Rev Med. 1999;50:355-67. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.med.50.1.355

5. **Ateba CN, Mbewe M.** Detection of *Escherichia coli* O157:H7 virulence genes in isolates from beef, pork, water, human and animal species in the northwest province, South Africa: Public health implications. Res Microbiol. 2011;162:240-8. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.med.50.1.355

6. **Doyle MP.** *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. Int J Food Microbiol. 1991;12:289-301. http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(91)90143-D

7. **Thomas KM, McCann MS, Collery MM, Logan A, Whyte P, McDowell DA, *et al*.** Tracking verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O26, O111, O103 and O145 in Irish cattle. Int J Food Microbiol. 2012;153:288-96. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.012

8. **Xavier RN, Morgan HW, McDonald IR, Withers H.** Effect of long-term starvation on the survival, recovery, and carbon utilization profiles of a bovine *Escherichia coli* O157: H7 isolate from New Zealand. Appl Environ Microbiol. 2014;80:4383-90. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00045-14

9. **Michino H, Akari K, Minami S, Takaya S, Sakai N, Miyazaki M, *et al.*** Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai city, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. Am J Epidemiol. 1999;150:787-96. http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a010082

10. **Pennington H.** *Escherichia coli* O157. Lancet. 2010;376:1428-35. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60963-4

11. **Park S, Worobo RW, Durst RA.** *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: A literature review. Crit Rev Biotechnol. 2001;21:27-48. http://dx.doi.org/10.1080/20013891081674

12. **Piedrahíta D, Márquez T, Máttar S.** Detección de *Escherichia coli* 0157: H7 en poblaciones porcinas, canal bovina y productos cárnicos en el departamento de Córdoba. Rev MVZ Córdoba. 2001;6:119-26.

13. **Mora A, Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Dhabi G, Echeita A, *et al.*** Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. Res Microbiol. 2005;156:793-806. http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2005.03.006

14. **Boucher HW, Corey GR.** Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2008;46 (Suppl.5):S344-9. http://dx.doi.org/10.1086/533590

15. **Martínez E, Hernández C, Pallares C, Pacheco R, Hurtado K, Recalde M.** Frecuencia de aislamientos microbiológicos y perfil de resistencia bacteriana en 13 clínicas y hospitales de alta complejidad en Santiago de Cali - Colombia. Infectio. 2014;18:3-11. http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392(14)70734-9

16. **Moellering RC.** MRSA: The first half century. J Antimicrob Chemother. 2012;67:4-11. http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr437

17. **Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, *et al.*** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. Int J Food Microbiol. 2007;117:219-22. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.006

18. **Shopsin B, Kreiswirth BN.** Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis. 2001;7:323-6.

19. **Guzmán-Blanco M, Mejía C, Isturiz R, Álvarez C, Bavestrello L, Gotuzzo E, *et al*.** Epidemiology of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. Int J Antimicrob Agents. 2009;34:304-8. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.06.005

20. **González L, Cortés JA.** Revisión sistemática de la farmacorresistencia en enterobacterias de aislamientos hospitalarios en Colombia. Biomédica. 2014;34:180-97. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.1550

21. **Machuca MA, González CI, Sosa LM.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causes both community-associated and health care-associated infections in children at the Hospital Universitario de Santander. Biomédica. 2014;34(Suppl.1):163-9. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1648

22. **Gemmell CG, Edwards DI, Fraise AP, Gould FK, Ridgway GL, Warren RE.** Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. J Antimicrob Chemother. 2006;57:589-608. http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl017

23. **Schroeder CM, Zhao C, Debroy C, Torcolini J, Zhao S, White DG, *et al*.** Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. Appl Environ Microbiol. 2002;68:576-81. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.2.576

24. **Zhang L, Pornpattananangku D, Hu C-MJ, Huang C-M.** Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. Curr Med Chem. 2010;17:585-94. http://dx.doi.org/10.2174/092986710790416290

25. **Radovic-Moreno AF, Lu TK, Puscasu VA, Yoon CJ, Langer R, Farokhzad OC.** Surface charge-switching polymeric nanoparticles for bacterial cell wall-targeted delivery of antibiotics. ACS Nano. 2012;6:4279-87. http://dx.doi.org/10.1021/nn3008383

26. **Soppimath K, Aminabhavi, Rudzinski WE T, Kulkarni AR.** Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. J Control Release. 2001;70:1-20. http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00339-4

27. **Kumari A, Yadav SK, Yadav SC.** Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids Surf B Biointerfaces. 2010;75:1-18. http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001

28. **Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ.** Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the *in vitro* activity of tigecycline. J Antimicrob Chemother. 2007;60:1018-29. http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm310

29. **Jeffery H, Davis SS, O'Hagan DT.** The preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. I: Oil-in-water emulsion solvent evaporation. Int J Pharm. 1991;77:169-75. http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173(91)90314-E

30. **Jones DS, Pearce KJ.** Contribution of process variables to the entrapment efficiency of propranolol hydrochloride within ethylcellulose microspheres prepared by the solvent evaporation method as evaluated using a factorial design. Int J Pharm. 1996;131:25-31. http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173(95)04298-9

31. **Rosca ID, Watari F, Uo M.** Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. J Control Release. 2004;99:271-80. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.07.007

32. **Loveymi BD, Jelvehgari M, Zakeri-Milani P, Valizadeh H.** Statistical optimization of oral vancomycin-eudragit rs nanoparticles using response surface methodology. Iran J Pharm Res. 2012;11:1001-12.

33. **Lotfipour F, Abdollahi S, Jelvehgari M, Valizadeh H, Hassan M, MIlani M.** Study of antimicrobial effects of vancomycin loaded PLGA nanoparticles against enterococcus clinical isolates. Drug Res (Stuttg). 2014;64:348-52. http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1358747

34. **Yang YY, Chia HH, Chung TS.** Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. J Control Release. 2000;69:81-96. http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00291-1

35. **Yang YY, Chung TS, Ng NP.** Morphology, drug distribution, and *in vitro* release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. Biomaterials. 2001;22:231-41. http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00178-2

36. **Martínez-Gutiérrez F, Olive PL, Bañuelos A, Orrantía E, Niño N, Sánchez EM, *et al*.** Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. Nanomedicine. 2010;6:681-8. http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2010.02.001

37. **Paredes-Guerrero DJ.** Estudio del efecto antibacteriano de nanopartículas de plata sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (tesis). Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander; 2011. p. 1-99.

38. **Abazinge M, Jackson T, Yang Q, Owusu-Ababio G.** Comparison of *in vitro* and *in vivo* release characteristics of sustained release ofloxacin microspheres. Drug Deliv. 2000;7:77-81. http://dx.doi.org/10.1080/107175400266632

39. **Hans ML, Lowman AM.** Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. Curr Opin Solid State Mater Sci. 2002;6:319-27. http://dx.doi.org/10.1016/S1359-0286(02)00117-1

40. **Li M, Rouaud O, Poncelet D.** Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. Int J Pharm. 2008;363:26-39. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.018

41. **Wischke C, Schwendeman SP.** Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. Int J Pharm. 2008;364:298-327. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.042

42. **Quintanar-Guerrero D, Fessi H, Allémann E, Doelker E.** Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. Int J Pharm. 1996;143:133-41. http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(96) 04697-2

43. **Desgouilles S, Vauthier C, Bazile D, Vacus J, Grossiord JL, Veillard M, *et al*.** The design of nanoparticles obtained by solvent evaporation: A comprehensive study. Langmuir. 2003;19:9504-10. http://dx.doi.org/10.1021/la034999q

44. **Vauthier C, Bouchemal K.** Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. Pharm Res. 2009;26:1025-58. http://dx.doi.org/10.1007/s11095-008-9800-3

45. **Redhead HM, Davis SS, Illum L.** Drug delivery in poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: *In vitro* characterisation and *in vivo* evaluation. J Control Release. 2001;70:353-63. http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00367-9

46. **Cheng YH, Illum L, Davis SS.** A poly(D,L-lactide-co-glycolide) microsphere depot system for delivery of haloperidol. J Control Release. 1998;55:203-12. http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00056-X

47 **Hermans K, van Den Plas D, Everaert A, Weyenberg W, Ludwig A.** Full factorial design, physicochemical characterisation and biological assessment of cyclosporine A loaded cationic nanoparticles. Eur J Pharm Biopharm. 2012;82:27-35. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.05.003

48. **Cheow WS, Hadinoto K.** Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles. Colloids Surf B Biointerfaces. 2011;85:214-20. http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.033

49. **Moghimi SM, Hunter AC.** Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. Trends Biotechnol. 2000;18:412-20. http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01485-2

50. **Hachicha W, Kodjikian L, Fessi H.** Preparation of vancomycin microparticles: Importance of preparation parameters. Int J Pharm. 2006;324:176-84. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.06.005

51. **Schugens C, Laruelle N, Nihant N, Grandfils C, Jkrome R, Teyssi P.** Effect of the emulsion stability on the morphology and porosity of semicrystalline poly l-lactide microparticles prepared by w/o/w double emulsion-evaporation. J Control Release. 1994;32:161-76. http://dx.doi.org/10.1016/0168-3659(94)90055-8

52. **Makadia HK, Siegel SJ.** Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. Polymers (Basel). 2011;3:1377-97. http://dx.doi.org/10.3390/polym3031377

53. **Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A.** Polymer-based nanocapsules for drug delivery. Int J Pharm. 2010;385:113-42. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018

54. **Jalil R, Nixonts JR.** Review biodegradable poly (lactic acid) and poly (1actide-co-glycolide) microcapsules: Problems associated with preparative techniques and release properties. Microencapsulation. 1990;7:297-325. http://dx.doi.org/10.3109/02652049009021842

55. **Hombreiro M, Zinutti C, Lamprecht A, Ubrich N, Astier A, Hoffman M, *et al*.** The preparation and evaluation of poly(ε-caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. J Control Release. 2000;65:429-38. http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00253-9

56. **Vrignaud S, Benoit JP, Saulnier P.** Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. Biomaterials. 2011;32:8593-604. http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.057

57. **Panyam J, William D, Dash A, Leslie-Pelecky D, Labhasetwar V.** Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. J Pharm Sci. 2004;93:1804-14. http://dx.doi.org/10.1002/jps.20094

58. **Mohanraj VJ, Chen Y.** Nanoparticles - A review. Trop J Pharm Res. 2007;5:561-73. http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v5i1.14634

59. **Kim IS, Lee SK, Park YM, Lee YB, Shin SC, Lee KC, *et al*.** Physicochemical characterization of poly(l-lactic acid) and poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles with polyethylenimine as gene delivery carrier. Int J Pharm. 2005;298:255-62. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.04.017

60. **Okeri HA, Arhewoh IM.** Analytical profile of the fluoroquinolone antibacterials. African J Biotechnol. 2008;7:670-80. http://dx.doi.org/10.5897/AJB07.174

61. **Allahverdiyev AM, Kon KV, Abamor ES, Bagirova M, Rafailovich M.** Coping with antibiotic resistance: Combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. Expert Rev Anti Infect Ther. 2011;9:1035-52. http://dx.doi.org/10.1586/eri.11.121

62. **Puglisi G, Fresta M, Mazzone G, Furneri PM, Tempera G.** Formulation parameters of fluoroquinolone-loaded liposomes and *in vitro* antimicrobial activity. Int J Pharm. 1995;118:65-76. http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173(94)00340-B

63. **Jeong Y II, Na HS, Seo DH, Kim DG, Lee HC, Jang MK, *et al*.** Ciprofloxacin-encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity. Int J Pharm. 2008;352:317-23. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.001

64. **Fresta M, Puglisi G, Giammona G, Cavallaro G, Micali N, Furneri PM.** Pefloxacine mesilate- and ofloxacin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Characterization of the colloidal drug carrier formulation. J Pharm Sci. 1995;84:895-902. http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600840721

65. **Chakraborty SP, Sahu SK, Mahapatra SK, Santra S, Bal M, Roy S, *et al*.** Nanoconjugated vancomycin: New opportunities for the development of anti-VRSA agents. Nanotechnology. 2010;21:105103. http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/21/10/105103

66. **Lai H-Z, Chen W-Y, Wu C-Y, Chen Y-C.** Potent antibacterial nanoparticles for pathogenic bacteria. ACS Appl Mater Interfaces. 2015;73:2046-54. http://dx.doi.org/10.1021/am507919m

67. **Liu P-F, Lo C-W, Chen C-H, Hsieh M-F, Huang C-M.** Use of nanoparticles as therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Curr Drug Metab. 2009;10:875-84. http://dx.doi.org/10.2174/138920009790274522

68. **Panyam J, Labhasetwar V.** Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. Adv Drug Deliv Rev. 2003;55:329-47. http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00228-4

69. **Xie S, Tao Y, Pan Y, Qu W, Cheng G, Huang L, *et al*.** Biodegradable nanoparticles for intracellular delivery of antimicrobial agents. J Control Release. 2014;187:101-17. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.034

Biomédica 2017;37:22-27
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3173

ARTÍCULO ORIGINAL

Genotipos circulantes del virus de la hepatitis C en Colombia

Óscar Santos[1], Alberto Gómez[2,3], Viviana Vizcaíno[3], María Consuelo Casas[3], María del Pilar Ramírez[4], Patricia Olaya[4]

[1] Unidad de Hepatología y Trasplante Hepático, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia
[2] Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia
[3] Instituto de Referencia Andino, Bogotá, D.C., Colombia
[4] Centro de Análisis Molecular, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La infección crónica por el virus de la hepatitis C es un problema de salud pública y se estima que hay más de 180 millones de personas infectadas en el mundo. En Colombia no se conoce la epidemiología de la infección ni los genotipos virales más frecuentes.
Objetivo. Describir los genotipos y subtipos del virus de la hepatitis C en pacientes colombianos infectados.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo y retrospectivo de pruebas realizadas en dos laboratorios de referencia nacional, entre el 2003 y el 2015, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, PAGE) o reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*quantitative PCR*, qPCR).
Resultados. Se estudiaron 1.538 aislamientos del virus de la hepatitis C de 1.527 pacientes con una edad promedio de 53 años, de los cuales 70 % tenía entre 40 y 70 años y 52 % eran mujeres. El 57 % de las pruebas se ordenaron en la ciudad de Bogotá, y el 80 % de los casos provenía de los departamentos de Cundinamarca, Valle y Atlántico. Se encontró el genotipo 1 en 88,6 % de los casos, distribuido así: subtipo 1b, 70 %, subtipo 1a, 13,5 %, y no determinado, 5,1 % de los casos; el genotipo 2 se encontró en el 5,4 % de los casos, el 3, en el 2 %, y el 4, en el 4 %. Se encontraron genotipos mixtos en 0,8 % de la muestra.
Conclusión. El genotipo 1 del virus de la hepatitis C es el que circula con mayor frecuencia en el país, con predominio del subtipo 1b.

Palabras clave: hepatitis C/genética; hepacivirus; genotipo; epidemiología; reacción en cadena de la polimerasa.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3173

Hepatitis C virus genotypes circulating in Colombia

Introduction: Chronic hepatitis C virus infection is a worldwide public health problem; it has been estimated that over 180 million people are infected with this virus worldwide. Its precise incidence and prevalence (i.e., epidemiology) and the most frequent circulating genotypes in Colombia are unknown.
Objective: To describe the hepatitis C virus (HCV) genotypes and subtypes in infected Colombian patients.
Materials and methods: We recovered the data on 1,538 HCV isolates from 1,527 patients in two Colombian reference laboratories typed by PAGE or qPCR.
Results: Patients' mean age was 53 years; 70% of them were 40 to 70 years old, and 52%, females; 57% of all tests were ordered in Bogotá and 80% of cases were from Cundinamarca, Valle and Atlántico departments. Genotype 1 was detected in 88.6% of cases, distributed as follows: 70% subtype 1b, 13.5% subtype 1a and 5.1%, undetermined subtypes. Genotype 2 was found in 5.4% of the patients, genotype 3 in 2% and genotype 4 in 4%. Mixed genotypes were found in 0.8% of the samples.
Conclusion: Genotype 1 is the most common HCV genotype circulating in Colombia, and subtype 1b the most frequent.

Key words: Hepatitis C/genetics; hepacivirus; genotype; epidemiology; polymerase chain reaction.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3173

Contribución de los autores:
Óscar Santos: diseño y análisis de datos
Alberto Gómez y Patricia Olaya: recolección y análisis de datos
María Consuelo Casas, María del Pilar Ramírez y Viviana Vizcaíno: recolección de datos
Todos los autores participaron en la redacción del artículo.

La hepatitis C crónica es una de las principales causas de enfermedad hepática crónica, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular en el mundo (1). Se estima que 2,8 % de la población mundial está infectado, es decir, más de 180 millones de personas, y el virus se asocia con, aproximadamente 400.000 muertes cada año (2,3). En la actualidad, la infección por hepatitis C es la principal causa de trasplante hepático en el mundo. Aunque las tasas de incidencia de la infección por el virus de la hepatitis C (HCV) en algunos países industrializados han disminuido, se espera que las tasas de muerte asociadas con la enfermedad hepática se incrementen en los próximos 20 años (4).

Los costos de la atención de los pacientes con hepatitis C y de sus complicaciones representan una gran carga para el sistema de seguridad social en salud, así que los esfuerzos deben concentrarse en la prevención de la transmisión de la infección, con agresivas campañas de educación del público en general, así como mediante la detección temprana de los pacientes infectados, aspecto este que es uno de los principales desafíos epidemiológicos, ya que más del 75 % de los pacientes son asintomáticos.

En los últimos años se han logrado grandes avances en el tratamiento de la hepatitis C y varios medicamentos han sido aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos y la *European Medical Agency* (EMA). Con tratamientos libres de interferón se ha logrado curar a más del 90 % de los pacientes (5). Sin embargo, el costo de los medicamentos es elevado y el acceso a ellos es difícil. En la elección del tratamiento se deben tener en cuenta varios aspectos, pero el genotipo y el subtipo del virus son fundamentales, ya que el desarrollo de nuevos medicamentos se ha enfocado en el genotipo 1 y se ha demostrado que la respuesta terapéutica es mejor en el subtipo 1b que en el 1a.

En el mundo predomina el genotipo 1 del HCV, pero la distribución cambia de una región a otra (6). En Latinoamérica, cada vez se conoce mejor la hepatitis C y aparecen múltiples publicaciones sobre los nuevos esquemas de tratamiento cada año, incluso, en ensayos clínicos multicéntricos.

Correspondencia:
Óscar Santos, Calle 61 sur N° 42-55, casa 117, Sabaneta, Colombia
Teléfono: (300) 391 0525
osmausa@yahoo.com

Recibido: 11/12/15; aceptado: 17/05/16

En nuestro país, no obstante, la información específica es escasa en todos los aspectos de la enfermedad: incidencia, prevalencia, genotipos, subtipos, morbilidad y mortalidad. El conocimiento de los genotipos circulantes del HCV en Colombia permitirá establecer los tratamientos idóneos, y facilitará el diseño de estrategias nacionales para el tratamiento y el control de la propagación de la infección.

Materiales y métodos

La información recopilada correspondió a 1.527 muestras de sangre analizadas entre marzo de 2003 y agosto de 2015: 1.194 de ellas se procesaron en el Centro de Análisis Molecular y, 333, en el Instituto de Referencia Andino, laboratorios de referencia nacional ubicados en Bogotá.

Durante el período mencionado, en el Centro de Análisis Molecular se emplearon dos métodos para la genotipificación del HCV. Entre el 2003 y el 2010, se hizo la secuenciación bidireccional de la región 5´ no codificante del HCV mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con el sistema Trugene® HCV 5´NC – Open Gene® DNA sequencing system de Visible Genetics®. Con este sistema se establecen el genotipo, el subgenotipo y el aislamiento viral. En el 2011, el Centro introdujo el paquete m2000 Real Time HCV Genotype II® de Abbott y comenzó a emplear indistintamente los dos métodos.

En el Instituto de Referencia Andino se utilizó la prueba Real Time HCV Genotype II® de Abbott, la cual consiste en un ensayo *in vitro* de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real previa transcripción inversa del ARN, para la determinación de los genotipos del HCV en suero y plasma de individuos infectados. Este ensayo detecta los genotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y los subtipos 1a y 1b, con la ayuda de sondas de oligonucleótidos marcadas por fluorescencia específica para el genotipo.

Análisis estadístico

Se hizo un estudio descriptivo de las variables sociodemográficas y de los genotipos y subtipos mediante el cálculo de proporciones, medidas descriptivas (promedio y desviación estándar, DE) y distribución de frecuencias. Para el análisis estadístico de los datos y la generación de cuadros de salida, se utilizó el paquete estadístico SPSS 18®.

Consideraciones éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Pablo Tobón Uribe y por los comités de los laboratorios participantes.

Resultados

Se analizaron 1.538 resultados de la genotipificación de muestras tomadas de 1.527 pacientes. Se registró la información sobre el sexo y la procedencia geográfica de todos los pacientes; en cuanto a la edad, se encontró la información de 1.431 pacientes (93,5 %). Del total de las muestras, el 52 % correspondía a mujeres. El promedio de edad fue de 53 años, con una desviación estándar de 14 años, siendo el grupo de 50 a 59 años de edad el más numeroso, en tanto que casi 70 % de los pacientes tenía entre 40 y 70 años de edad. Hubo pacientes desde los nueve hasta los 91 años de edad (cuadro 1).

En cuanto a la procedencia de las muestras, se encontró que 80 % de ellas procedía, en orden de frecuencia, de los departamentos de Cundinamarca, Valle y Atlántico. En cuanto a las ciudades, el 57 % de las muestras provenía de Bogotá, seguida de Cali, con 8,6 %, y Barranquilla, con 6,7 %. Las muestras provenientes de Antioquia correspondieron a 6,4 % y, las de Medellín, a 5,9 % (cuadro 2).

Se revisaron 1.538 aislamientos y el genotipo 1 se registró en 88,6 % de los casos, de los cuales el 70 % correspondía al subtipo 1b, el 13,5 % al subtipo 1a, en tanto que en 5,1 % de los casos no fue posible establecer el subtipo. El genotipo 2 se encontró en 5,4 % de las muestras, el genotipo 3 en el 2 % y el genotipo 4 en el 4 %. La distribución de todos los genotipos y subtipos se presenta en el cuadro 3. En 11 (0,7 %) pacientes se encontraron dos genotipos concomitantes o mixtos, así: en todos se encontró el genotipo 1, y en 60 %, el subtipo 1b, en tanto que ocho muestras presentaban, además, el genotipo 4, dos, el genotipo 2 y una, el genotipo 3. Antes del 2012 fueron muy pocos los pacientes con genotipo 4, pero desde entonces se encontraron con mayor frecuencia en la ciudad de Bogotá (90 % de los casos), especialmente en 2014 y 2015.

Discusión

La infección crónica por el HCV es un problema de salud pública y se estima que más de 180 millones de personas están infectadas en el mundo (2). Infortunadamente, Colombia carece de estadísticas exactas con respecto a la incidencia, la prevalencia, los genotipos virales y el impacto de la enfermedad en la morbilidad y la mortalidad, así que en este estudio se reporta una información importante que vale la pena analizar con detenimiento.

Cuadro 1. Distribución de las muestras por grupos de edad (n=1.527)

Grupo de edad (años)	n	%
0-9	2	0,1
10-19	16	1,0
20-29	97	6,4
30-39	146	9,6
40-49	194	12,7
50-59	471	30,8
60-69	387	25,3
70-79	106	6,9
80 y más	12	0,8
Sin dato	96	6,3
Total	1.527	100

Cuadro 2. Distribución de las muestras según localización geográfica (n=1.527)

Departamento	n	%
Cundinamarca	874	57,2
Valle del Cauca	235	15,4
Atlántico	111	7,3
Antioquia	98	6,4
Risaralda	30	2,0
Bolívar	26	1,7
Quindío	25	1,6
Santander	23	1,5
Norte de Santander	21	1,4
Magdalena	18	1,2
Cauca	16	1,0
Cesar	10	0,7
Nariño	8	0,5
Caldas	7	0,5
Huila	5	0,3
La Guajira	4	0,3
Meta	4	0,3
Sucre	3	0,2
Tolima	3	0,2
Córdoba	3	0,2
Boyacá	2	0,1
Arauca	1	0,1
Total	1.527	100

Aunque este no es el primer estudio que se hace en Colombia sobre los genotipos del HCV (7-9), sin lugar a dudas es el más grande reportado hasta el momento, ya que incluyó más de 1.500 muestras recolectadas durante más de 10 años.

Según los resultados del estudio, el genotipo 1 y el subtipo 1b predominan en el país. En un estudio previo sobre genotipos, Alvarado, *et al.,* reportaron los resultados de las muestras de 184 donantes altruistas de bancos de sangre con anticuerpos positivos, recolectadas entre el 2003 y el 2007, con PCR positiva en 53 individuos, aunque solo en 35 muestras se logró la genotipificación y el análisis filogenético correspondientes (8). Los autores

Cuadro 3. Distribución de genotipos y subtipos del virus de la hepatitis C (N=1.538)

Genotipo	Subtipo	n	%
1	1b	1.073	70
	1a	209	13,5
	1	79	5,1
	Subtotal	1.361	88,6
2	2	62	4,0
	2a o 2c	7	0,5
	2a	8	0,5
	2b	6	0,4
	Subtotal	83	5,4
3	3	24	1,5
	3a	7	0,5
	Subtotal	31	2,0
4	4	62	4,0
Total		1.538	100

informaron que el 88 % de los casos se asoció con el genotipo 1 (subtipo 1b: 83 % y subtipo 1a: 5 %), el 9 %, con el genotipo 2 (subtipo 2a: 6 % y subtipo 2b: 3 %), y el 3 %, con el genotipo 3; además, hicieron un interesante análisis filogenético del virus que sugería la aparición de este subtipo 1b hace más de 50 años en Bogotá, asociado casi exclusivamente con transfusiones de hemoderivados.

Asimismo, en un estudio posterior, Di Filippo, *et al.*, describieron los genotipos de 12 pacientes con infección crónica por el HCV adquirida después de una transfusión en casos documentados en Bogotá y Medellín, de los cuales el 83 % correspondía al genotipo 1 y, el 67 %, al subtipo 1b (9). Los resultados de estos estudios preliminares son muy similares a los hallazgos del presente estudio.

El genotipo 1 del HCV es el más frecuente en el mundo (46 %), sin embargo, el porcentaje y la distribución de los subtipos varía en cada región y país (10). En el estudio de Kershenobich, *et al.*, se describió la epidemiología del virus en Latinoamérica y se encontró que la prevalencia en los países participantes variaba entre 1 y 2,3 %, con predominio del genotipo 1 en porcentajes mayores de 80 % en Perú, México y Puerto Rico, y cercanos a 60 % en Argentina y Brasil; en cuanto al subtipo, el 1b fue más frecuente en México, Venezuela y Brasil, y el 1a, en Puerto Rico y Perú (10), siendo este último el que predomina también en Estados Unidos (11).

La confirmación en el presente trabajo del predominio del genotipo 1 y el subtipo 1b en Colombia es importante por varios factores: primero, este genotipo y el subtipo se han relacionado especialmente con las transfusiones sanguíneas, y la exposición parenteral en procedimientos médicos, paramédicos y dentales, en los cuales ha habido una inadecuada reutilización y disposición de elementos como agujas, jeringas y otros, lo que sugiere que estas vías son los principales modos de transmisión de la infección en Colombia; segundo, tiene un impacto relevante en cuanto a los nuevos tratamientos, los cuales se han concentrado en el manejo del genotipo 1, con tasas de éxito contra el subtipo 1b mayores que contra el 1a (12). El genotipo menos frecuente fue el 3, lo cual es un hecho afortunado, ya que la efectividad de los medicamentos existentes es inferior en este subgrupo de pacientes. Según los datos del presente estudio, el 70 % de los pacientes en Colombia podría tratarse fácil y exitosamente con los actuales tratamientos libres de interferón aprobados en el país; además, el 90 % podría beneficiarse de los nuevos esquemas de tratamiento.

Entre los datos epidemiológicos importantes puede resaltarse la baja prevalencia de otros genotipos diferentes al 1, con tasas que han permanecido bajas en el tiempo. En Colombia no se ha documentado hasta el momento ninguna infección por los genotipos 5 o 6, los cuales se han reportado especialmente en el sur de África y en el sureste de Asia, respectivamente (1,6). Por el contrario, llama la atención el incremento de casos del genotipo 4 en los últimos dos años en Bogotá, la mayoría relacionados con la infección concomitante de HIV y HVC. El genotipo 4 tiene mayor prevalencia en el área comprendida entre África central y Oriente Medio, pero, al igual que en otros países del mundo, se ha observado un incremento de este genotipo relacionado con la migración de pacientes o de contactos de usuarios de drogas intravenosas o de personas infectadas por el HIV en esas regiones (13).

También, es importante resaltar los casos con genotipos mixtos en el presente estudio (0,8 %), todos ellos correspondientes al genotipo 1, y en el 70 % con presencia simultánea del genotipo 4. En el mundo hay reportes de infecciones mixtas con diferentes genotipos o subtipos del virus y prevalencias de 5 a 25 % de los casos (14), pero casi exclusivamente confinadas a poblaciones de alto riesgo como usuarios de drogas intravenosas, en los cuales deben tratar de diferenciarse las infecciones consecutivas y las reinfecciones (15). En estos raros casos se recomienda que el tratamiento se centre en combatir el genotipo más difícil de tratar.

Uno de los grandes retos en la infección por el HCV es el diagnóstico de la mayor cantidad de pacientes para poder clasificarlos y decidir su tratamiento. En un país de grandes recursos económicos como Estados Unidos, solo el 50 % de los pacientes sabe que está infectado, el 30 % de ellos es remitido a consulta especializada y apenas el 10 % recibe tratamiento (12). En Colombia, la situación no es mejor. Además, se ha documentado que hasta 50 % de los pacientes en Estados Unidos no tiene un factor de riesgo evidente para la infección (16-18). En ese país, una estrategia efectiva para incrementar el diagnóstico es la tamización universal de los nacidos entre 1945 y 1965, los llamados *baby boomers*, una población asociada con una prevalencia cinco veces mayor de hepatitis C que la población general (19). Según los datos de este estudio, el 70 % de los pacientes tenía entre 40 y 70 años de edad, así que sería muy interesante hacer estudios para explorar la hipótesis de que este subgrupo de pacientes tendría una mayor probabilidad de estar infectado, lo cual permitiría concluir, eventualmente, que requieren de una tamización universal, independientemente de la presencia de factores de riesgo.

La distribución geográfica de los casos en este estudio no coincidió con la distribución de la densidad poblacional en el país, lo cual podría responder a las áreas de influencia de los laboratorios participantes en el estudio. Hay que aceptar que existen diferencias regionales en la prevalencia de la infección y que sería importante hacer estudios para confirmar tales diferencias. Sin embargo, es muy preocupante que en la mitad de los departamentos del país se hayan hecho menos de diez pruebas durante el periodo del estudio, lo cual confirma la baja tasa de búsqueda y de detección de casos de hepatitis C en gran parte del país.

La principal limitación de este estudio reside en que la muestra de pacientes se diseñó por conveniencia e incluyó a individuos en quienes se hizo la genotipificación del HCV con el fin de decidir su esquema de tratamiento, por lo cual no representa un universo real de la población infectada por el virus, así que los resultados pueden tener sesgo. Por otra parte, su principal fortaleza es que se trata del estudio sobre hepatitis C con mayor número de pacientes reportado hasta el momento en el país, por lo cual la información debe tenerse en cuenta y servir de ayuda en la planeación de un adecuado estudio epidemiológico de la infección crónica por el virus de la hepatitis C en Colombia.

En conclusión, según los resultados de este estudio, el genotipo circulante del virus de hepatitis C que predomina en Colombia es el genotipo 1 (89 %) y, en el 70 % de estas muestras, el subtipo 1b. Los grandes avances en el tratamiento del virus de la hepatitis C deben complementarse con la detección masiva de los pacientes y con el tratamiento, pues, de otra forma, el impacto en la salud pública será mínimo. Para ello se requiere el compromiso del gobierno, de la comunidad médica e, incluso, de la industria farmacéutica, de manera que sea posible tener tratamientos accesibles para los pacientes.

Agradecimientos

Los autores agradecen especialmente al personal de apoyo en el Centro de Análisis Molecular y en el Instituto de Referencia Andino, por su colaboración durante este trabajo.

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

Financiación

No se recibió ninguna financiación específica para el estudio.

Referencias

1. **Cooke GS, Lemoine M, Thursz M, Gore C, Swan T, Kamarulzaman A, *et al*.** Viral hepatitis and the global burden of disease: A need to regroup. J Viral Hepat. 2013;20:600-1. http://dx.doi.org/10.1111/jvh.12123
2. **Mohd-Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST.** Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. Hepatology. 2013;57:1333-42. http://dx.doi.org/10.1002/hep.26141
3. **Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP.** The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. J Hepatol. 2006;45:529-38. http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2006.05.013
4. **Razavi H, ElKhoury AC, Elbasha E, Estes C, Pasini K, Poynard T, *et al*.** Chronic hepatitis C virus (HCV) disease burden and cost in the United States. Hepatology. 2013;57:2164-70. http://dx.doi.org/10.1002/hep.26218
5. **American Association for the Study of Liver Diseases and Infectious Diseases Society of America.** Recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C, 2015. Fecha de consulta: 30 de noviembre de 2015. Disponible en: http://www.hcvguidelines.org
6. **Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, *et al*.** Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. Hepatology. 2015;61:77-87. http://dx.doi.org/10.1002/hep.27259

7. **Guevara LG, Idrovo V, Martínez JD, Hurtado M, Fassler S, Serrano C, *et al.*** Serotipificación para el virus de la hepatitis C en pacientes con diagnóstico de hepatitis C crónica. Rev Col Gastroenterol. 1997;12:21-4.

8. **Alvarado M, Malta C, Soares M, Gutiérrez M, Carrilho F, Rebello J.** Molecular characterization, distribution, and dynamics of hepatitis C virus genotypes in blood donors in Colombia. J Med Virol. 2010;82:1889-98. http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21908

9. **Di Filippo D, Cortés-Mancera F, Beltrán M, Arbeláez M, Jaramillo S, Restrepo JC, *et al*.** Molecular characterization of hepatitis C virus in multi-transfused Colombian patients. Virol J. 2012;9:242-9. http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-9-242

10. **Kershenobich D, Razavi H, Sánchez-Ávila J, Bessone F, Coelho H, Dagher L, *et al*.** Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. Liver Int. 2011;31(Suppl.2):18-29. http://dx.doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02538.x

11. **Cheung RC.** Epidemiology of hepatitis C virus infection in American veterans. Am J Gastroenterol. 2000;95:740-7. http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2000.01854.x

12. **European Association for the Study of the Liver.** EASL recommendations on treatment of hepatitis C, 2015. J Hepatol. 2015;63:199-236. http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.03.025

13. **Payan C, Roudot-Thoraval F, Marcellin P, Bled N, Duverlie G, Fouchard-Hubert I, *et al*.** Changing of hepatitis C virus genotype patterns in France at the beginning of the third millenium: The GEMHEP Geno CII Study. J Viral Hepat. 2005;12:405-13. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2893.2005.00605.x

14. **Pham S, Bull R, Bennett J, Rawlinson W, Dore G, Lloyd A, *et al*.** Frequent multiple hepatitis C virus infections among injection drug users in a prison setting. Hepatology. 2010;52:1564-72. http://dx.doi.org/10.1002/hep.23885

15. **Blackard JT, Sherman KE.** Hepatitis C virus coinfection and superinfection. J Infect Dis. 2007;195:519-24. http://dx.doi.org/10.1086/510858

16. **Holmberg SD, Spradling PR, Moorman AC, Denniston MM.** Hepatitis C in the United States. N Engl J Med. 2013;368:1859-61. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMp1302973

17. **Ghany M, Strader D, Thomas D, Seeff L.** Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An update. Hepatology. 2009;49:1335-74. http://dx.doi.org/10.1002/hep.22759

18. **Denniston MM, Jiles RB, Drobeniuc J, Klevens RM, Ward JW, McQuillan GM, *et al*.** Chronic hepatitis C virus infection in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey 2003 to 2010. Ann Intern Med. 2014;160:293-300. http://dx.doi.org/10.7326/M13-1133.

19. **Smith BD, Morgan RL, Beckett GA, Falck-Ytter Y, Holtzman D, Ward JW.** Hepatitis C virus testing of persons born during 1945–1965: Recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention. Ann Intern Med. 2012;157:817-22. http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-157-9-201211060-00529

Biomédica 2017;37:28-33
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3174

ARTÍCULO ORIGINAL

Descripción de las mutaciones de *Mycobacterium tuberculosis* que confieren resistencia a rifampicina e isoniacida detectadas mediante GenoType® MTBDR*plus* V.2 en Colombia.

Claudia Llerena, Raquel Medina

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

Introducción. La metodología de GenoType® MTBDR*plus* V.2 es una técnica molecular aprobada por la Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud para la detección de las mutaciones en el gen *rpo*β del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, las cuales confieren resistencia a la rifampicina, y las de los genes *katG* e *inhA* que la confieren frente a la isoniacida. Debido a la variación genética en las cepas circulantes a nivel mundial, los programas nacionales de control de la tuberculosis deben comprobar el desempeño de los nuevos métodos de diagnóstico para su aplicación como prueba rápida.
Objetivo. Describir las mutaciones detectadas mediante la técnica GenoType® MTBDR*plus* V.2 en muestras pulmonares y aislamientos de *M. tuberculosis* procesados en el Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Nacional de Salud durante el 2014.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio retrospectivo descriptivo que determinó la expresión de los genes *inhA*, *KatG* y *rpo*β responsables de la resistencia a isoniacida y rifampicina, utilizando la técnica GenoType® MTBDR*plus* V.2 en 837 muestras y aislamientos de casos de tuberculosis.
Resultados. Se obtuvieron 689 resultados de pruebas: 581(84,3 %) sensibles, 58 (8,4 %) resistentes y 50 (7,2 %) multirresistentes. Se detectaron diversas mutaciones en el gen *rpo*β, de las cuales la más frecuente fue la Ser531Leu (36,6 %), seguida por la Asp516Val (21,6 %), en tanto que en el gen *katG* la más frecuente fue la Ser315Thr1 (91,9 %).
Conclusiones. Se detectaron varias mutaciones en los casos resistentes reportados en el país, con frecuencias similares a las reportadas en otros países de la región de América del Sur.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis; resistencia a medicamentos; mutación; rifampicina; isoniacida.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3174

Description of *Mycobacterium tuberculosis* mutations conferring resistance to rifampicin and isoniazid detected by GenoType® MTBDR*plus* V.2 in Colombia

Introduction: The GenoType®MTBDR*plus*V.2 assay is a molecular technique endorsed by the World Health Organization and the Pan American Health Organization that allows for the identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and the detection of mutations in the *rpo*β gene for rifampicin resistance, and *katG* and *inhA* genes for isoniazid resistance. Due to the genetic variability in the circulating strains around the world, the national tuberculosis control programs should assess the performance of these new diagnostic technologies and their use under program conditions as rapid tests.
Objective: To describe the mutations identified by the GenoType®MTBDR*plus*V.2 assay in pulmonary samples and *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the *Laboratorio Nacional de Referencia* of the *Instituto Nacional de Salud* in 2014.
Materials and methods. We conducted a retrospective, descriptive study to detect the expression of *inhA*, *KatG* and *rpo*β genes, responsible for resistence against isoniazid and rifampicin using the GenoType® MTBDR*plus* V.2 assay in 837 samples and isolates from tuberculosis cases.
Results: Several mutations in the *rpo*β gene were identified. Ser531Leu was the most frequent (36.6%) followed by Asp516Val (21.6%), while Ser315Thr1 was the most frequent mutation in the *katG* gene (91.9%).
Conclusions: We were able to identify different mutations present in MDR-TB strains in the country, with frequencies similar to those reported in other countries in the South American region.

Keys words: *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis; drug resistance; mutation; rifampicin; isoniazid.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3174

Contribución de los autores:
Claudia Llerena: concepción, diseño y desarrollo de los experimentos
Raquel Medina: análisis de los datos
Las dos autoras participaron en la escritura del manuscrito.

La aparición y diseminación de cepas resistentes a los principales fármacos disponibles para el tratamiento de la tuberculosis constituyen un gran problema para el control de la enfermedad a nivel mundial, debido al aumento de casos de tuberculosis multirresistente (TB-MDR), de aquellos causados por *Mycobacterium tuberculosis* con resistencia *in vitro* a isoniacida y rifampicina, y de casos extremadamente resistentes (TB-XDR), en los cuales se presenta, además, resistencia a las fluoroquinolonas y a los medicamentos inyectables de segunda línea.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en el 2014 se diagnosticaron 9,6 millones de casos nuevos de tuberculosis, de los cuales 480.000 serían multirresistentes, pero las dos estimaciones resultaron inferiores a los casos efectivamente notificados a nivel mundial (1). En ese mismo año, en Colombia se reportaron 12.824 casos de tuberculosis en todas sus formas, de los cuales 103 fueron multirresistentes y, dos, extremadamente resistentes (2,3).

En su plan de respuesta a esta amenaza, la OMS sugiere la implementación de pruebas de laboratorio rápidas para la tamización de la resistencia. En el 2008, recomendó el uso de métodos moleculares del tipo de sondas en línea, entre los cuales se cuenta la prueba comercial GenoType® MTBDR*plus* (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany), con sensibilidad de 97 % y especificidad de 99 % para rifampicina, y de 90 % y 99 % para isoniacida en muestras pulmonares con baciloscopia positiva o aislamientos de *M. tuberculosis* en medios de cultivo sólidos o líquidos, con lo cual se obtienen resultados rápidos, en especial, cuando se trabaja directamente con muestras (4,5).

La metodología de GenoType® MTBDR*plus* V.2 se basa en la amplificación del ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación inversa, lo cual permite detectar el complejo *M. tuberculosis*, y las mutaciones responsables de la resistencia a la rifampicina en el gen *rpo*β y las determinadoras de resistencia a la isoniacida en los genes *katG* e *inhA*. Esta técnica ha sido evaluada por los programas nacionales de control de la tuberculosis en varios países de la región, pues, además de la presencia de resistencia, su uso permite determinar la variabilidad genética de *M. tuberculosis* a nivel mundial.

El diagnóstico de tuberculosis en Colombia se hace principalmente mediante baciloscopia y cultivo, según lo establecido por el Laboratorio Nacional de Referencia para la Red Nacional de Laboratorios. Desde el 2012, la Red ha venido incorporando los nuevos métodos moleculares y hoy el país cuenta con 22 laboratorios de salud pública y de instituciones prestadoras de servicios de salud que cuentan con este tipo de pruebas, así como el Laboratorio Nacional de Referencia, lo cual favorece la oportunidad en la detección de los casos resistentes.

El objetivo de este trabajo fue describir las mutaciones del gen *rpo*β que confieren resistencia a la rifampicina y las de los genes *katG* e *inhA* de resistencia a la isoniacida, detectadas mediante la técnica GenoType® MTBDR*plus* V.2 en muestras de esputo y aislamientos de *M. tuberculosis* procesadas en el Laboratorio Nacional de Referencia durante el 2014.

Materiales y métodos

Este es un estudio de tipo retrospectivo descriptivo.

Muestras de esputo

El Laboratorio Nacional de Referencia recibió 167 muestras de esputo para diagnóstico de tuberculosis resistente procedentes de 27 laboratorios de salud pública del país, las cuales se descontaminaron y se concentraron mediante el método de NaOH-N-acetil-L-cisteína. La baciloscopia se hizo con la coloración de Ziehl-Neelsen, cultivo en medio de Löwenstein-Jensen y en medio líquido BBL™ MGIT™ (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*), siguiendo las recomendaciones de los manuales de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) para baciloscopia y cultivo sólido, y las indicaciones de la casa comercial (Becton-Dickinson) para el cultivo en medio líquido.

Aislamientos de Mycobacterium tuberculosis

Se recibieron 670 aislamientos de *M. tuberculosis* de muestras sembradas en los laboratorios de la Red según los protocolos y manuales de procesamiento de cada institución, los cuales deben enviarse a los laboratorios de salud pública y, de ahí, al Laboratorio Nacional de Referencia cuando hay crecimiento, para hacer la prueba de sensibilidad. Todos los resultados obtenidos

Correspondencia:
Claudia Llerena, Grupo de Micobacterias, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 220 7700, extensión 1260
cllerena@ins.gov.co

Recibido: 02/03/16; aceptado: 18/05/16

mediante la prueba molecular fueron confirmados por la técnica Bactec MGIT™, considerada como la prueba de referencia.

Extracción del ADN

El ADN se extrajo utilizando el estuche I GenoLyse® DNA Extraction, según instrucciones del fabricante.

Genotype MTBDR plus V.2

Se empleó la prueba siguiendo las instrucciones descritas en el inserto del estuche comercial. Para la amplificación por PCR se utilizó un termociclador de HAIN Lifesciences con los protocolos "MDR DIR" para muestras y "MDR CUL" para cultivos. La hibridación se hizo en un equipo Twincubator®. Se aplicaron controles internos para descartar contaminación con el ADN mediante la evaluación de los reactivos del GenoLyse y las condiciones previas de mezcla de la PCR.

En la prueba se emplean tiras de nitrocelulosa, las cuales tienen 23 sondas; las primeras tres son los controles internos de la prueba (control de conjugado, de amplificación y de detección del complejo *M. tuberculosis*). Para la detección de la resistencia a rifampicina, hay un control de locus y ocho sondas silvestres (*wildtype,* WT) que permiten analizar el segmento entre el codón 505 y el 533, y cuatro sondas específicas para las mutaciones (MUT): Asp516Val, His526Tyr, His526Asp y Ser531Leu. Para la identificación de la resistencia a la isoniacida de alto nivel hay un control de locus, una sonda silvestre que analiza el codón 315 del gen *katG* y dos sondas específicas para las mutaciones Ser315Thr1 y Ser315Thr2. Para determinar la resistencia a isoniacida de bajo nivel, hay un control de locus, dos sondas silvestres y cuatro sondas para las mutaciones C15T, A16G, T8C y T8A.

La lectura de los resultados de las pruebas, así como la interpretación de los patrones de bandas, se hicieron de forma visual utilizando la plantilla incluida en el estuche.

Análisis estadístico de los datos

Se recolectaron y analizaron los datos en una base de datos en Excel®, en la cual se registró el patrón de bandas observado.

Resultados

Se hicieron 837 pruebas, 670 de cultivos y 167 de muestras de esputo. Se obtuvieron 689 resultados de pruebas, de las cuales 581 (84,3 %) resultaron sensibles, 58 (8,4 %), resistentes, y 50 (7,2 %), multirresistentes; 28 pruebas no pudieron interpretarse debido a irregularidades en el patrón de las bandas y en 120 no hubo amplificación del ADN (cuadro 1).

Mutaciones detectadas en los casos resistentes a rifampicina

Se consideraron como resistentes los patrones de bandas en los que hubo ausencia de una sonda silvestre y presencia de una sonda de mutación, y los patrones de bandas que presentaron ausencia de dos bandas silvestres sin mutación. En 60 de los aislamientos y muestras, se detectaron mutaciones resistentes a rifampicina.

Se observaron siete patrones de banda diferentes en las tiras de prueba, siendo la ausencia de WT8 y la presencia de MUT3 el patrón más frecuente (22 casos, 36,6 %), el cual corresponde a la mutación Ser531Leu. En 13 (21,6 %) de los aislamientos, se evidenció la ausencia de WT3 y de WT4 con presencia de MUT1, siendo este el segundo patrón más frecuente. Se observó un patrón de heterorresistencia en un aislamiento que presentaba todas las sondas WT y una sonda MUT3 (cuadro 2).

Cuadro 1. Resultados obtenidos con la prueba GenoType® MTBDR*plus* V.2

Perfiles de resistencia	n	%
Sensibles	581	84,3
Resistencia a isoniacida (H)	48	7
Resistencia a rifampicina (R)	10	1,4
Tuberculosis multirresistente	50	7,2
Total de pruebas	689	100

Cuadro 2. Patrones de bandas de resistencia a rifampicina

Patrón	n	%	Mutación
Ausencia de WT8 y presencia de MUT3	22	36,6	Ser531Leu
Ausencia de WT3 y WT4 y presencia de MUT1	13	21,6	Aps516Val
Ausencia de WT7 y presencia de MUT2B	11	18,3	His526Tyr
Ausencia de WT7 y de presencia MUT2A	6	10,0	His526Asp
Ausencia de WT2 y WT3 sin mutación	4	6,6	Desconocida
Ausencia de WT3 y WT7 sin mutación	2	3,3	Desconocida
Ausencia de WT2 y WT7 sin mutación	1	1,6	Desconocida
Presencia de todos las WT y MUT 3	1	1,6	-
Total	60	100	-

Mutaciones detectadas en los casos resistentes a isoniacida

Se encontraron 98 aislamientos que presentaron resistencia a isoniacida. El 99 % de las mutaciones ocurrió en el gen *KatG*. El patrón más frecuente fue la ausencia de WT y la presencia de MUT1 en 90 aislamientos (91,9 %), el cual corresponde a la mutación Ser315Thr1 con resistencia de alto nivel. Se observó un patrón con ausencia total del gen *katG,* el cual se interpretó como resistente, y un aislamiento con mutación en el gen *inhA* y un patrón de ausencia de WT1 y presencia de MUT1, el cual corresponde a la mutación C15T (cuadro 3).

Cuadro 3. Patrones de bandas de resistencia a isoniacida

	n	%	Mutación
Patrón en el gen *katG*			
Ausencia de WT y presencia de MUT1	90	91,9	Ser315Thr1
Ausencia de WT y presencia de MUT2	5	5,1	Ser315Thr2
Ausencia total del *katG*	2	2,0	Desconocida
Patrón en el gen *inhA*			
Ausencia de WT1 y presencia de MUT1	1	1,0	C15T

Resultados no interpretables

Se obtuvieron 28 pruebas con resultados no interpretables. Para rifampicina, se encontraron patrones de bandas que solo presentaban ausencia de una sonda WT y ausencia de sondas MUT, o con alguna sonda WT de poca intensidad en el color del revelado, es decir, muy tenue. Se observaron patrones con ausencia de WT8, WT7, WT6 y WT2, que tampoco fueron concluyentes.

Como parte de la metodología de procesamiento en el LNR, todas las pruebas moleculares se confirmaron con el sistema Bactec MGIT™, en tanto que en los casos no interpretables el reporte de resultados se hizo mediante el método convencional.

Aislamientos sin resultados de amplificación

En 18 aislamientos no se obtuvo la amplificación del ADN debido a que correspondían a otras especies de micobacterias y en 102 muestras de esputo registradas como positivas, se observaron pocos bacilos o fueron negativas en la baciloscopia.

Discusión

La implementación de técnicas moleculares para el diagnóstico de la tuberculosis resistente y multirresistente es relativamente reciente en el país. Es importante que la Red Nacional de Laboratorios continúe promoviendo su adopción en aquellas instituciones que cuentan con la capacidad técnica y el recurso humano, pues este proceso de descentralización fortalece las actividades de detección y diagnóstico del programa, ya que se emplean métodos que cuentan con el aval de la OMS y la OPS por haber comprobado su idoneidad a nivel mundial y sus ventajas, tales como la rapidez en la obtención de resultados, aproximadamente seis horas en muestras con baciloscopia positiva. En aquellos casos con uno a nueve bacilos ácido-alcohol resistentes en 100 campos microscópicos observados, o con baciloscopia negativa, no se recomienda el uso de esta prueba, ya que no se logra la amplificación del ADN. La implementación de este tipo de pruebas de forma rutinaria favorecería la tamización de la resistencia y, en consecuencia, el inicio del tratamiento adecuado.

En varios países se ha implementado este tipo de pruebas con base en los datos de concordancia con las técnicas convencionales y la frecuencia de las mutaciones evaluadas (6-9). La divulgación de tales resultados ha permitido compartir la información sobre la variabilidad genética de las cepas circulantes en las regiones del mundo, la presencia de diferentes mutaciones y si confieren resistencia a los fármacos o no. Por esta razón, es importante que las redes nacionales de laboratorios que decidan comenzar a aplicar estas técnicas evalúen la pertinencia de su uso, determinando si las mutaciones reconocidas corresponden a las mismas que el estuche comercial detecta para, así, validar su utilidad como método de diagnóstico (10).

Con respecto a la resistencia a la rifampicina, en este estudio se encontró que el 36,6 % (22/60) de los casos resistentes presentaban el patrón de ausencia de WT8 y presencia de MUT3, lo cual corresponde a la mutación Ser531Leu. Se observó, igualmente, el patrón de ausencia de WT3 y WT4 y presencia de MUT1 en 21,6 % (13/60) de las muestras, patrón que corresponde a la mutación Asp516Val, en tanto que en el 18,3 % (11/60) de las muestras se presentó el patrón de ausencia de WT7 y presencia de MUT2B, es decir, la mutación His526Tyr.

En estudios en otros continentes se ha evidenciado que la mutación Ser531Leu es la más frecuente, con porcentajes entre 41 y 73 % (11-13). En la región de las Américas, Chile, Argentina y Perú, reportan frecuencias entre 56 y 67 % (14,15). En Colombia, Ferro, *et al.,* registraron una frecuencia de 64 % para esta misma mutación en aislamientos provenientes de la región del Valle del Cauca (16).

Al comparar estos datos con los obtenidos en nuestro estudio, es claro que hay diferencias en las proporciones encontradas, lo cual demuestra que es necesario verificar la utilidad de estas pruebas como un ejercicio rutinario para decidir con respecto a su implementación como método de diagnóstico. Dicha evaluación debe considerar la epidemiología de la enfermedad, pues es posible que existan variaciones, incluso entre zonas con alta prevalecía de resistencia a fármacos, como puede verse por las diferencias entre los resultados de este trabajo y lo reportado por Ferro, *et al.* (16).

La resistencia a isoniacida se presentó en 99 % de los aislamientos debido a mutaciones en el gen *katG*, siendo la mutación Ser315Thr1 la más frecuente (91,9 %; 90/98). Al comparar estos datos con los obtenidos por Asencios, *et al.*, en Perú (15), donde la mutación en *katG* más frecuente fue la MUT1, con 71,2 % de los casos, los datos del presente estudio fueron similares en términos de frecuencia. En el estudio de Tessema (11), se encontró que el 100 % de las mutaciones estaban en la MUT1, lo cual coincide con lo reportado en el presente trabajo y resalta la variabilidad genética.

Solo se presentó un aislamiento con resistencia en el gen *inhA*. En otros estudios en la región de las Américas, esta mutación se ha reportado con poca frecuencia, sin embargo, es fundamental que los programas realicen un estudio más detallado de su prevalencia y relevancia dado que el profesional clínico debe definir un esquema de tratamiento del caso con base en tales resultados (14,15).

Se reportaron 23 (3,34 %) casos no interpretables en cuanto a su resistencia a rifampicina debido a la ausencia de una sonda WT (WT8, WT7, WT6 y WT2) y de la sonda MUT, lo cual sugiere la presencia de mutaciones en el gen *rpo*β que no están presentes en la tira reactiva de este estuche comercial, y plantea la necesidad de hacer estudios para determinar mejor su frecuencia. Alonso, *et al.* (17), reportaron que la ausencia de la WT3 sin mutación puede presentarse cuando hay mutaciones silenciosas; puesto que esta es una de las limitaciones de los métodos estudiados, en estos casos es fundamental hacer una prueba fenotípica, idealmente con técnicas de secuenciación para determinar si se trata de mutaciones poco frecuentes y cuál es su relevancia clínica.

En Colombia, se identificaron diversas mutaciones del gen *rpo*β que generaban resistencia a la rifampicina, de las cuales la más frecuente fue la Ser531Leu, aunque en menor porcentaje que en otros países. En cuanto a la resistencia a isoniacida, la mutación más común asociada a la resistencia de alto nivel fue la Ser315Thr1 en el gen *katG*.

Con estos datos puede concluirse que la técnica de GenoType® MTBDR*plus* V.2 permite reconocer las mutaciones más frecuentes asociadas a la resistencia y que, en los casos con resultados no interpretables, debe considerarse la confirmación mediante pruebas fenotípicas e incluir también a aquellos pacientes cuya evolución clínica y bacteriológica sugiere resistencia.

Una característica importante de *M. tuberculosis* es que los mecanismos de su resistencia a los fármacos no están completamente descritos y, aunque la presencia de mutaciones es el principal, deben considerarse otros como las bombas de expulsión activa, en el cual el diagnóstico de farmacorresistencia solo se logra mediante una prueba convencional (18).

Se evidencian, así, nuevas oportunidades de investigación para evaluar las mutaciones que no se habían detectado antes, así como su relevancia clínica para el país.

Agradecimientos

A los profesionales y al equipo de apoyo técnico-administrativo del Laboratorio de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan no haber tenido ningún conflicto de intereses.

Financiación

El estudio se financió con los recursos del Instituto Nacional de Salud.

Referencias

1. **World Health Organization.** Global tuberculosis control WHO report – 2015. Fecha de consulta: 22 de junio de 2014. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1
2. **Instituto Nacional de Salud.** Informe final, tuberculosis, Colombia - 2014. Fecha de consulta: 22 de junio de 2014. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiolgico/Tuberculosis%202014.pdf
3. **Instituto Nacional de Salud.** Tuberculosis farmacorresistente nuevo evento de notificación obligatoria – 2014. Fecha de consulta: 22 de junio de 2014. Disponible en: http://www.ins.gov.co/Noticias/Memorias%20Reunin%20Nacional%20de%20Vigilancia%20y%20Control%20e/2-3-TB%20resistente.pdf

4. **World Health Organization.** The Global MDR-TB and XDR-TB response plan 2007-2008. Fecha de consulta: 22 de junio de 2014. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/2007/global_response_plan.pdf

5. **World Health Organization.** Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB). Policy statement - 2008. Fecha de consulta: 22 de junio de 2014. Disponible en: http://www.who.int/tb/features_archive/policy_statement.pdf

6. **Imperiale B, Zumárraga M, Weltman G, Zudiker R, Cataldi A, Morcillo M.** First evaluation in Argentina of the GenoType®MTBDR*plus* assay for multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* detection from clinical isolates and specimens. Rev Argent Microbiol. 2012;44:283-9.

7. **Lacoma A, García N, Prat C, Ruiz J, Haba L, Rosés S, *et al*.** GenoType MTBDR*plus* assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples. J Clin Microbiol. 2008;46:3660-7. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00618-08

8. **Akpaka P, Shirematee B, Clarke D, Lorraine F, Rastogi N.** Evaluations of methods for rapid detection of resistance to isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in the Caribbean. J Clin Microbiol. 2008;46:3426-8. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01455-08

9. **Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Simak T, Malomanova N, Fedorin I, Drobniewski F.** Performance of the Geno Type®MTBDR*plus* assay in the diagnosis of tuberculosis and drug resistance in Samara, Russian Federation. BMC Clin Pathol. 2009;9:1-9. http://dx.doi.org/10.1186/1472-6890-9-2

10. **Filliol I, Driscoll J, van Soolingen D, Kreiswirth B, Kremer K, Valétudie G, *et al*.** Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. Emerg Infect Dis. 2002;8:1347-9. http://dx.doi.org/10.3201/eid0811.020125

11. **Tessema B, Beer J, Emmrich F, Sack U, Rodloff A**. Analysis of gene mutations associated with isoniazid, rifampicin and ethambutol resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopia. BMC Infect Dis. 2012;12:1-7. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-12-37

12. **Zhang L, Ye Y, Duo L, Wang T, Song X, Lu X, *et al*.** Application of GenoType® MTBR *plus* in rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin in a high volume laboratory in Southern China. Mol Biol Rep. 2011;38:2185-92. http://dx.doi.org/10.1007/s11033-010-0347-0

13. **Tracevska T, Jansone I, Broka L, Marga O, Baumanis V.** Mutations in the *rpoB* and *katG* genes leading to drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Latvia. J Clin Microbiol. 2002;40:3789-92. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.10.3789-3792.2002

14. **Araya P, Velasco M, Tognarelli J, Arias F, Leiva T, Sccapatticio A.** Detección de mutaciones asociadas a cepas multidrogorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* en Chile. Rev Med Chile. 2011;139:467-73. http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872011000400008

15. **Asencios L, Galarza M, Quispe N, Vásquez L, Leo E, Valencia E, *et al*.** Prueba molecular GenoType® MTBDR plus, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogorresistente. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2012;29:92-8.

16. **Ferro B. García P, Nieto L, Soolingen D.** Predictive value of molecular drug resistance of *Mycobaberium tuberculosis* isolates in Valle del Cauca Colombia. J Clin Microbiol. 2013;51:2220-4. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00429-13

17. **Alonso M, Palacios J, Herranz M, Penedo A, Menéndez A, Bouza E.** Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassigment of resistance category. J Clin Microbiol. 2011;49:2688-90. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00659-11

18. **Coll P.** Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27:474-80. http://dx.doi.org/.10.1016/j.eimc.2009.06.010

Biomédica 2017;37:34-41
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3208

ARTÍCULO ORIGINAL

Seroprevalencia de la infección por dengue en los municipios de Armenia, Calarcá, La Tebaida y Montenegro en el departamento del Quindío, 2014

Mónica Marcela Jiménez[1], Jesús Arias[2], Gabriel Carrasquilla[1]

[1] Eje de Salud Pública, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Programa de Control de Vectores, Secretaría Departamental de Salud del Quindío, Quindío, Colombia

Introducción. El dengue representa un grave problema de salud pública para Colombia y, en el departamento del Quindío, afecta el 90 % de los municipios. Se necesitan estudios actualizados sobre la seroprevalencia en la población general para reforzar las acciones de salud pública.
Objetivo. Determinar la seroprevalencia de la infección por dengue en barrios con alta incidencia de dengue en cuatro municipios del departamento del Quindío: Armenia, Calarcá, La Tebaida y Montenegro, en 2014.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio de prevalencia mediante muestreo probabilístico estratificado y bietápico. Se hizo una encuesta a 658 sujetos residentes del área urbana de los municipios seleccionados y se les tomó una muestra de sangre por venopunción para determinar anticuerpos IgG e IgM contra el virus del dengue.
Resultados. La seroprevalencia de anticuerpos IgG en el Quindío fue de 89,4 %; en Armenia fue de 88,7 %, en Calarcá, de 81,5 %, en Montenegro, de 91,8 %, y en La Tebaida, de 97,8 %. La seroprevalencia de anticuerpos IgM en Quindío fue de 14,2 %; en Armenia, de 11,5 %, en Calarcá, de 13,0 %, en Montenegro, de 13,1%, y en La Tebaida, de 28,9 %.
Conclusiones. Se evidenció una alta prevalencia de anticuerpos IgG e IgM en los cuatro municipios. En todos los grupos de edad se encontraron personas seropositivas para IgM, lo cual indicaría infección reciente. La seropositividad simultánea para IgM e IgG (12,9 %) puede indicar infección secundaria por otro serotipo del virus o una infección en los tres meses anteriores. Es necesario impulsar estrategias multisectoriales para el control de la transmisión del dengue en el Quindío.

Palabras clave: dengue/epidemiología; prevalencia; inmunoglobulina G; inmunoglobulina M; salud pública, Colombia.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3208

Seroprevalence of dengue infection in the municipalities of Armenia, Calarcá, La Tebaida and Montenegro in Quindío, 2014

Introduction: Dengue is a serious public health problem in Colombia; it is prevalent in 90% of the municipalities in Quindío. Studies on its seroprevalence are required to address public health interventions.
Objective: To establish the seroprevalence of dengue infection in neighborhoods with high incidence in the municipalities of Armenia, Calarcá, La Tebaida and Montenegro, Quindío, in 2014.
Materials and methods: We conducted a probabilistic, stratified, two-stage prevalence study. We interviewed 658 residents in the urban area of the selected municipalities. After they signed the informed consent, we took a blood sample to determine dengue IgG and IgM antibodies.
Results: Seroprevalence of IgG in Quindío was 89,4%; in Armenia it was 88,7%, in Calarcá, 81,5%, in Montenegro, 91,8% and in La Tebaida 97,8%. IgM was 14, 2% in Quindío; in Armenia it was 11,5%, in Calarcá, 13,0%, in Montenegro, 13,1% and in La Tebaida, 28,9%.
Conclusions: We found a high prevalence of both IgG and IgM in the four municipalities. We had positive results for IgM in all age groups, which suggests recent infection. We also found simultaneous

Contribución de los autores:
Mónica Marcela Jiménez: concepción del estudio, coordinación de recolección de información en campo, y análisis e interpretación de los datos
Gabriel Carrasquilla: diseño y dirección del estudio, revisión del análisis
Jesús Arias: coordinación de actividades a cargo de la Secretaría de Salud del Quindío
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

seropositivity for IgG and IgM (12.9%), which may indicate infection by another serotype or presence of infection in the past three months. A multisectoral approach is necessary for dengue control in Quindío.

Key words: Dengue/epidemiology; prevalence; immunoglobulin G; immunoglobulin M; public health, Colombia.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3208

El dengue representa un grave problema de salud pública para las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, el cual ha aumentado en zonas urbanas y semiurbanas (1). La infección es ocasionada por un virus ARN de la familia Flavivirus, del cual existen cuatro serotipos estrechamente relacionados (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4), cada uno de los cuales puede producir la enfermedad (2). La infección por uno de los serotipos no genera inmunidad protectora a largo plazo contra los demás serotipos y una infección secundaria tiene más probabilidades de evolucionar a dengue grave (1,3). El virus puede ser transmitido al ser humano por la picadura de mosquitos hembras infectadas de los géneros *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Este mosquito vive generalmente en hábitats urbanos y se reproduce principalmente en recipientes artificiales que contienen agua almacenada. La enfermedad puede presentarse de forma asintomática o presentar una evolución potencialmente mortal (4). En la actualidad, no existe tratamiento específico contra el dengue; sin embargo, en estudios recientes se ha demostrado la eficacia de una vacuna tetravalente como forma de prevenir el dengue grave y de reducir las hospitalizaciones (5-7).

La incidencia del dengue en el mundo ha aumentado notoriamente, y hoy es endémico en cerca de 100 países de África, las Américas, el Mediterráneo Oriental, Asia Suroriental y el Pacífico Occidental (3). En los estudios sobre la prevalencia del dengue se ha estimado que 3.900 millones de personas en 128 países están en riesgo de infección por los virus del dengue (3). Las estimaciones recientes indican que se producen 390 millones de infecciones por dengue cada año, de las cuales 96 millones se manifiestan clínicamente cualquiera que sea su gravedad (8). Las tendencias mundiales observadas en el 2014 indicaron un aumento de casos en China, Fiji, las islas Cook, Malasia y Vanuatu (3). Cada año, unas 500.000 personas con dengue grave, en su mayoría niños, requieren hospitalización y, aproximadamente, 2,5 % fallecen (1,3).

En el 2015 se notificaron en América Latina 2,35 millones de casos, de los cuales más de 10.200 fueron graves; además, se registraron 1.181 muertes (3) y se evidenció la circulación de los cuatro serotipos en 11 países (3,4). En ese mismo año se notificó un aumento en el número de casos en Brasil y otros países vecinos (3).

El dengue en Colombia es endemo-epidémico. Los principales sitios para su transmisión son los cascos urbanos, en donde más de la mitad de la población vive por debajo de los 1.800 msnm y está en riesgo permanente de enfermar. El 70 % de los casos de dengue se concentra en 57 municipios, entre los cuales se encuentran los cuatro de este estudio (9). La urbanización creciente, el crecimiento poblacional, los procesos migratorios, las condiciones socioeconómicas, las dificultades en el abastecimiento de agua, el calentamiento global, la ecología del vector y la circulación simultánea de los cuatro serotipos del virus, constituyen factores clave para el incremento de los casos en el país. En 2012, se notificaron al Sistema de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) del Instituto Nacional de Salud 53.532 casos de dengue. En 2013, se reportaron 126.425 casos, de los cuales el 97,4 % correspondió a dengue y, el 2,6 %, a dengue grave. Al comparar el año 2013 con el 2012, se observó un aumento del 136,1 % (10). En 2014, se notificaron al Sivigila 110.473 casos, de los cuales el 97,5 % correspondió a dengue y, el 2,5 %, a dengue grave (11). En ese año, las entidades territoriales con incidencias superiores a la nacional (404 casos por 100.000 habitantes) fueron: Guainía, Guaviare, Amazonas, Putumayo, Meta, Santander, Casanare, Huila, Cundinamarca, Tolima, Sucre, Vichada, Quindío, Boyacá y Arauca (4).

En un reciente estudio en áreas endémicas de cuatro países de América Latina en una población de jóvenes entre 9 y 16 años de edad, mediante serología se encontró una incidencia probable de 3,6 casos por 100 personas al año; en Colombia,

Correspondencia:
Mónica Marcela Jiménez, Eje de Salud Pública, Fundación Santa Fe de Bogotá, Carrera 7B N° 123-90, edificio corporativo, piso 3, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 603 0303, extensión 5710; fax: (571) 214 6668
monica.jimenez@fsfb.org.co

Recibido: 04/01/16; aceptado: 18/05/16

incluidos los cuatro municipios de este estudio, se reportó una incidencia de 1,2 y una seroprevalencia para IgG de 91,8 % (12).

En el Quindío, el dengue afecta al 90 % de los municipios, la mayoría de los cuales se consideran endémicos, y con transmisión activa y permanente (9). Entre los factores que determinan esta situación, está la gran población que se moviliza en un territorio pequeño para visitar los atractivos turísticos de la zona, las características eco-epidemiológicas y geográficas, y la transmisión de los cuatro serotipos, como ocurre en la mayoría de los municipios del país (9).

Se estima que gran parte de las infecciones por dengue no se registran por tratarse de casos asintomáticos o leves (13) y que no todos los casos que se diagnostican en los servicios de salud se notifican, lo cual impide conocer la real magnitud de la enfermedad. A nivel regional se ha registrado un subregistro de 8 % para fiebre por dengue y de 1,3 para dengue grave (14), lo cual indica una subestimación muy importante de los casos en el país que debe tenerse en cuenta.

El presente estudio se llevó a cabo para contribuir a orientar las acciones de salud pública, atender de manera oportuna los casos, conocer el nivel de transmisión de la enfermedad y encaminar las acciones hacia el mejoramiento de las condiciones de salud de las comunidades afectadas. Su objetivo fue determinar la seroprevalencia de anticuerpos IgM e IgG contra el virus del dengue en las poblaciones de los municipios de Armenia, Calarcá, Montenegro y La Tebaida en el 2014.

Materiales y métodos

Tipo de estudio

Se hizo un estudio de prevalencia con muestreo probabilístico estratificado y bietápico en el área urbana de los municipios de Armenia, La Tebaida, Calarcá y Montenegro entre mayo y agosto de 2014.

Diseño y tamaño de la muestra

El marco muestral estaba constituido por las personas residentes en el área urbana de los municipios de Armenia, Calarcá, La Tebaida y Montenegro, en barrios que fueron determinados por la Secretaría Departamental de Salud.

Se diseñó una muestra probabilística, estratificada y bietápica, con el municipio como variable de estratificación. Las unidades primarias de muestreo fueron las manzanas de los barrios seleccionados: 521 manzanas en Armenia, 83 en Calarcá, 142 en La Tebaida y 58 en Montenegro, para un total de 804. Las unidades secundarias de muestreo fueron las viviendas: 12.165 en Armenia, 1.865 en Calarcá, 2.416 en La Tebaida y 975 en Montenegro, para un total de 17.421. La fuente de información para las unidades de muestreo fue el programa de prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores del departamento del Quindío. La unidad de análisis y de observación fueron los individuos. El tamaño de la muestra se calculó asumiendo una prevalencia esperada del 85 % (12), una precisión del 5 % y un nivel de confianza del 95 %, estimación que se basó en los datos reales sobre dengue suministrados por el programa de control de vectores y por el Sivigila. El tamaño de la muestra fue de 677 sujetos considerando la estratificación por municipio, el cual se calculó en el programa en Epidat v4.0.

Recolección de la información

Para obtener la información se diseñó un cuestionario estructurado sobre variables sociodemográficas y la presencia de fiebre. Se entrenó a todo el personal involucrado en el estudio para la selección de la vivienda, la aplicación de la encuesta y la toma de muestras. En la vivienda seleccionada se incluyeron todas las personas que voluntariamente aceptaron participar en el estudio. Una vez firmado el consentimiento o el asentimiento (para los menores de edad), se tomó una muestra de sangre por venopunción a cada uno de los participantes: 10 ml a los adultos y 5 ml a los niños menores de cinco años. Cada muestra se rotuló y se almacenó, garantizando la conservación de la cadena de frío a una temperatura entre 4 y 8 °C hasta su llegada al laboratorio clínico municipal o departamental, donde se sometieron a centrifugación para separar el suero y se almacenaron a una temperatura de -20 °C hasta el momento de enviarlas al laboratorio clínico del Instituto Colombiano de Medicina Tropical en Medellín para su procesamiento.

En el laboratorio se utilizó un ensayo inmunoenzimático para IgG e IgM contra el virus del dengue mediante la técnica ELISA. Para la determinación de anticuerpos IgG, se usó el estuche ELISA IgG Elisa Dengue Virus IgG DxSelect™, prueba que tiene una sensibilidad de 96 % ($IC_{95\%}$ 89,3-99,2 %) y una especificidad de 93 % ($IC_{95\%}$ 89,7-96,0 %) (15). Para la determinación de anticuerpos IgM, se utilizó el estuche Dengue IgM capture ELISA®, prueba que tiene una sensibilidad para infecciones primarias y

secundarias de 94,7 % ($IC_{95\%}$ 85,4-98,9 %) y de 55,7 % ($IC_{95\%}$ 46,6-64,7 %), respectivamente, y una especificidad del 100 % ($IC_{95\%}$ 95,7-100 %) (16). La técnica empleada fue validada previamente en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical.

Los resultados de las pruebas se interpretaron de la siguiente manera: ELISA IgM negativo, sin exposición al virus del dengue en los últimos tres meses; ELISA IgM positivo, exposición al virus del dengue en los últimos tres meses; ELISA IgG negativo, ausencia de exposición al virus del dengue, y ELISA IgG positivo, contacto previo con el virus del dengue en algún momento.

Simultáneamente con la toma de la muestra de sangre, se hizo una encuesta estructurada a cada participante, o a los cuidadores en el caso de los niños, mediante un dispositivo móvil de captura de datos suministrado por Fio Corporation. La información se almacenó, se integró y se organizó en una base de datos para su análisis.

Análisis de datos

La información obtenida se procesó en hojas de cálculo de Microsoft Excel®. Para el análisis estadístico se generaron los pesos de ponderación del diseño y se utilizó el módulo de muestras complejas del paquete estadístico SPSS®, versión 18 (17). Para describir las variables se utilizaron medidas de frecuencia, tendencia central y dispersión. Se estimó la seroprevalencia de infección por el virus del dengue con su respectivo intervalo de confianza de 95 %.

Consideraciones éticas

Este estudio se rigió por la Resolución 8430 de 1993 y fue aprobado por el Comité de Ética de la Fundación Santa Fe de Bogotá. Se contó con el aval de la Secretaría Departamental de Salud del Quindío para las visitas domiciliarias. Todas las encuestas y la toma de muestras de sangre se hicieron con previo consentimiento o asentimiento informados.

Resultados

Se encuestaron 658 personas en los cuatro municipios seleccionados para el estudio: 460 personas (69,9 %) de Armenia, 92 (14,0 %) de Calarcá, 61 (9,3 %) de Montenegro y 45 (6,8 %) de La Tebaida. El 67,9 % eran mujeres, el 48,8 % tenía un nivel educativo de secundaria, el 46,6 % era soltero, el 92 % pertenecía a los estratos socioeconómicos 1 y 2, y el 66 % estaba inscrito en el régimen contributivo (cuadro 1). La edad osciló entre los 4 y los 94 años, con un promedio de 37,1 años (desviación estándar, DE=20,3), y el 28,6 % de la población estudiada estaba entre los 25 y 44 años.

La seroprevalencia de IgG fue de 89,4 % ($IC_{95\%}$ 86,2-91,9 %) y la de IgM fue de 14,2 % ($IC_{95\%}$ 11,6-17,2 %) en los cuatro municipios estudiados (cuadro 2). La mayor seroprevalencia de IgG se observó en La Tebaida, en donde prácticamente toda la población ha tenido contacto con el virus del dengue; además, también presentó la mayor seroprevalencia de IgM.

La seroprevalencia de IgG aumentó a medida que aumentaba la edad, en tanto que dos terceras partes de los menores de cinco años fueron positivos y más del 90 % de los mayores de 25 años había tenido contacto con el virus del dengue. En los menores de cinco años se encontró la mayor seroprevalencia de IgM. Las mujeres presentaron las mayores seroprevalencias, tanto de IgG (90,6 %) como de IgM

Cuadro 1. Características sociodemográficas de los participantes en el estudio, municipios de Quindío, 2014

Variable	n	%
Sexo		
Mujer	447	67,9
Hombre	211	32,1
Grupo de edad (años)		
0-4	3	0,5
5-14	89	13,5
15-24	137	20,8
25-44	188	28,6
45-64	169	25,7
65 y más	72	10,9
Nivel educativo		
Primaria	240	37,4
Secundaria	325	48,8
Técnico	35	5,5
Universitario	29	4,2
Ninguno	29	4,1
Estado civil		
Soltero	303	46,6
Casado	110	16,0
Unión libre	174	27,0
Separado	25	3,8
Viudo	46	6,5
Estrato socioeconómico		
1	271	41,2
2	341	51,8
3	41	6,2
4	5	0,8
Afiliación al sistema de salud		
Contributivo	438	66,0
Subsidiado	142	22,8
Especial	21	3,2
No Afiliado	57	8,0

Cuadro 2. Seroprevalencia de anticuerpos IgG e IgM para dengue, municipios de Quindío, 2014

Variable	IgG					IgM			
	n	Frecuencia	Prevalencia (%)	Intervalo de confianza de 95 %		Frecuencia	Prevalencia (%)	Intervalo de confianza de 95 %	
				Inferior	Superior			Inferior	Superior
Municipio									
Armenia	460	408	88,7	84,8	91,7	53	11,5	8,9	14,8
Calarcá	92	75	81,5	66,4	90,8	12	13	7,4	22,1
Montenegro	61	56	91,8	79,9	96,9	8	13,1	6,5	24,6
La Tebaida	45	44	97,8	85,9	99,7	13	28,9	18,8	41,6
Total	658								
Grupo de edad (años)									
0-4	3	2	61,6	12,2	94,9	1	38,4	5,1	87,8
5-14	89	63	75,2	64,7	83,4	8	10	4,9	19,3
15-24	137	123	90,6	84,1	94,6	21	16,5	10,8	24,3
25-44	188	172	91,8	86,7	95	19	11,5	6,8	18,7
45-64	169	157	92,8	86,6	96,2	26	17,5	12,2	24,5
65 y más	72	66	92,1	83,8	96,3	11	13,9	7,8	23,6
Total	658								
Sexo									
Mujer	447	402	90,6	87,3	93,1	62	15,5	12,1	19,7
Hombre	211	181	86,8	80,9	91	24	11,3	7,8	16
Total	658								
Estrato socioeconómico									
1	271	251	93	87,9	96,1	36	14,8	10,7	20,3
2	341	300	89,1	84,4	92,6	46	14,4	10,9	18,8
3	41	29	69,9	55,1	81,4	2	4,4	1,2	15,5
4	5	3	60	30,4	83,7	2	40	16,3	69,6
Total	658								
Nivel educativo									
Ninguno	29	26	88,9	69,9	96,5	5	16,2	6,8	34
Primaria	240	220	92,4	88	95,3	40	18,6	13,8	24,6
Secundaria	325	285	88,5	84,2	91,8	34	11,1	8,2	14,9
Técnica	35	30	86,2	70,3	94,3	3	11,1	3,4	31
Universitario	29	22	76,3	58,1	88,2	4	12,8	5,2	28,4
Total	658								
Afiliación al sistema de salud									
Contributivo	438	388	89,30	85,30	92,30	57	13,90	10,70	17,80
Subsidiado	142	131	93,00	87,30	96,20	23	18,20	12,00	26,60
Especial	21	19	90,40	73,50	96,90	0			
No afiliado	57	45	79,10	61,40	90,00	6	10,90	4,80	22,90
Total	658								

(15,5 %). En el estrato socioeconómico más bajo, el uno, la seroprevalencia de IgG (93,0%) fue la más alta, y en el estrato socioeconómico más alto, el cuatro, lo fue la de IgM (40,0 %). Vale la pena señalar que la frecuencia de la seroprevalencia de IgM en el estrato cuatro fue baja en las personas positivas. Se observó una tendencia decreciente en la seroprevalencia de IgG a medida que ascendía el estrato socioeconómico. Las personas con nivel educativo de primaria tuvieron las más altas seroprevalencias de IgG (92,4 %) y de IgM (18,6 %). La seropositividad de IgG tendió a la disminución a medida que aumentaba el nivel educativo. Con respecto al tipo de régimen de seguridad social, las mayores seroprevalencias de IgG (93,0 %) y de IgM (18,2 %) se observaron en los afiliados al régimen subsidiado (cuadro 2).

La seroprevalencia simultánea de IgM e IgG en la población estudiada fue de 12,9 %, en tanto que la de IgM entre quienes manifestaron no haber tenido fiebre durante los siete días anteriores a la toma de la muestra fue de 13,5 %.

Discusión

El estudio se realizó en el departamento del Quindío, uno de los entes territoriales con mayor notificación de casos de dengue en Colombia. Los resultados en los municipios de estudio confirmaron

la intensidad de la transmisión del dengue y determinaron la seroprevalencia, con lo cual se clasificarían como hiperendémicos.

La determinación de la seroprevalencia de IgG e IgM es de gran utilidad en salud pública, especialmente si se consideran los resultados de estudios recientes sobre la vacuna tetravalente, los cuales demuestran que hay mejor respuesta (mayor eficacia) en las poblaciones con mayor seroprevalencia. Con esta vacuna se podría reducir la incidencia de la infección sintomática, la hospitalización y los casos de dengue grave (5-7).

Se encontró una seroprevalencia de IgG de 89,4 % y de IgM de 14,2 %. La seroprevalencia de IgG resultó similar a la reportada por otros estudios en Colombia (en Quindío, Casanare y Meta), en los cuales se registró una seroprevalencia de 92,5 % en 1.200 sujetos de 9 a 16 años de edad (12).

En algunos estudios en otros países del mundo con características ecológicas, biológicas y sociales similares a las de Colombia, se han reportado prevalencias altas de anticuerpos contra el virus del dengue, parecidas a las de este estudio. La seroprevalencia de anticuerpos IgG entre la población general en Jáltipan (México) en 2003 fue de 79,6 % (18); en Puerto Rico, en 2006, fue de 92 % en 275 donantes de sangre (19), y en Samoa Americana, en 2010, fue de 95,6 % en 794 personas entre los 18 y 87 años de edad (20). Los resultados de la seroprevalencia de anticuerpos IgG de este estudio fueron más altos que los encontrados en 1996 en la región del Urabá antioqueño, donde fue de 59,1 % (21).

En los cuatro municipios estudiados se encontró una mayor prevalencia de IgG (90,6 %) en la población femenina. Estos resultados son comparables con los encontrados en Samoa Americana en 2010 (94,9 %) (20) y mayores que los encontrados por Restrepo, *et al.,* en el Urabá antioqueño, donde la seropositividad fue mayor en las mujeres (64,6 %) que en los hombres (21). La alta seroprevalencia de IgG e IgM en mujeres probablemente se debe a su mayor exposición durante las labores en el hogar, ya que el vector transmisor del dengue, por lo general, tiene sus criaderos dentro de las viviendas (6,12).

Se ha reportado que el dengue afecta a individuos de todos los grupos de edad. En este estudio se encontró una seroprevalencia de IgG de más de 90 % en las personas a partir de los 15 años de edad. En los menores de cinco años la seroprevalencia de IgM fue la más alta (38,4 %); sin embargo, la seroprevalencia de IgG registró niveles (61,6 %) superiores a los reportados en el Urabá antioqueño (31,5%) (21). Los resultados en este grupo de edad también sugerirían que la vivienda es un foco de transmisión de la infección.

La seroprevalencia de IgM fue mayor en las mujeres (15,5 %) que en los hombres (11,3 %). En todos los grupos de edad se encontraron personas seropositivas para IgM, lo cual es indicativo de infección reciente.

La seropositividad de IgM fue alta en aquellas personas que manifestaron no haber tenido fiebre en los siete días anteriores a la toma de la muestra (13,5 %). Resultados similares se reportaron en un estudio en Santa Cruz, Puerto Cabello, Venezuela (25,3 %) en 316 menores de 15 años, lo cual hace pensar en una infección reciente causada por cualquiera de los serotipos que podría haber cursado sin síntomas (dengue asintomático) (13).

La seropositividad conjunta de IgM e IgG en la población estudiada fue de 12,9 %, lo cual podría indicar una infección secundaria por otro de los serotipos del virus del dengue y un aumento en el riesgo de complicaciones en un próximo brote. En Pakhtunkhawa, Pakistán, en 2011, la seroprevalencia conjunta de IgG e IgM en 612 pacientes sospechosos de dengue fue de 52,12 % (22).

A medida que aumentó el nivel educativo se redujo de forma leve la seropositividad para IgG e IgM, situación similar a lo sucedido con el nivel socioeconómico, a excepción de lo observado en el estrato socioeconómico cuatro. Entre las personas con poco nivel educativo y bajo nivel socioeconómico, hay un mayor desconocimiento de la enfermedad, de la forma en que se transmite, y de la manera de controlarla y prevenirla. Además, sus condiciones de vida aumentan la probabilidad de la presencia de criaderos de vectores (23).

En todos los grupos de edad se encontraron personas seropositivas para IgM, lo cual indicaría una infección reciente. La seropositividad simultánea de IgM e IgG en la población estudiada podría indicar una infección secundaria por otro de los serotipos del virus, sin embargo, también podría indicar una infección en los tres meses anteriores, lo cual aumenta el riesgo de complicaciones en un próximo brote.

Los resultados evidencian la necesidad de intensificar el desarrollo de estrategias integrales de vigilancia epidemiológica, prevención y control del dengue con trabajo multidisciplinario.

Agradecimientos

A la Secretaría de Salud Departamental del Quindío y a las autoridades de salud de los municipios de Armenia, Calarcá, Montenegro y La Tebaida, por el apoyo durante el proceso de recolección de la información en campo. Al Laboratorio Departamental de Salud Pública del Quindío y a los laboratorios clínicos de los hospitales de los municipios del estudio, por permitir el procesamiento y almacenamiento de las muestras de suero. Al Laboratorio Clínico y de Investigación y al personal del Instituto Colombiano de Medicina Tropical de la Universidad CES, por el apoyo, procesamiento y análisis de las muestras. Al equipo de investigación en campo y al Centro de Estudios "Fundadores Armenia" de la Fundación Santa Fe de Bogotá, por el apoyo logístico permanente. A Fio Corporation, por el suministro de los dispositivos electrónicos y el apoyo en la recolección de la información en campo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiación

Este proyecto fue financiado por la Gobernación del Quindío y la Secretaría de Salud en el marco del contrato de prestación de servicios No. 1062 del 27 de diciembre de 2013.

Referencias

1. **World Health Organization.** Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. Fecha de consulta: 9 de noviembre de 2015. Disponible en: http://www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/.
2. **Murray NE, Quam MB, Wilder-Smith A.** Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects. Clin Epidemiol. 2013;5:299-309. http://dx.doi.org/10.2147/CLEP.S34440
3. **Organización Mundial de la Salud.** Dengue y dengue grave. Nota descriptiva No. 117, mayo de 2015. Fecha de consulta: 9 de noviembre de 2015. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/.
4. **Mercado M.** Informe final dengue, Colombia, 2014. Fecha de consulta: 9 de noviembre de 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiolgico/Dengue%202014.pdf.
5. **Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Rivaldo Cunha R, Deseda C, *et al*.** Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. N Engl J Med. 2015;372:113-23. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1411037
6. **Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SR, Ismail H, Chotpitayasunondh T, Chua MN, *et al*.** Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: A phase 3, randomized, observer-masked, placebo-controlled trial. Lancet. 2014;384:1358-65. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61060-6
7. **Hadinegoro SR, Arredondo-García JL, Capeding MR, Deseda C, Chotpitayasunondh T, Dietze R, *et al*.** Efficacy and long-term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease. N Engl J Med. 2015;372:113-23. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1506223
8. **Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, *et al*.** The global distribution and burden of dengue. Nature. 2013;496:504-7. http://dx.doi.org/10.1038/nature12060
9. **Padilla JC, Rojas DP, Sáenz-Gómez R.** Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Bogotá: Guías de Impresión Limitada; 2012. p. 80-3.
10. **Instituto Nacional de Salud.** Semana epidemiológica número 51 de 2013 (15 al 21 de diciembre de 2013). Fecha de consulta: 9 de noviembre de 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20EpidemioIgico/2013%20Boletin%20epidemiologico%20Semana%2051.pdf
11. **Instituto Nacional de Salud.** Semana epidemiológica número 53 de 2014 (28 de diciembre de 2014 a 3 de enero de 2015). Fecha de consulta: 28 de junio de 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20EpidemioIgico/2014%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2053.pdf.
12. **Dayan G**, **Arredondo JL**, **Carrasquilla G**, **Deseda CC**, **Dietze R, Luz K**, ***et al*.** Prospective cohort study with active surveillance for fever in four dengue-endemic countries in Latin America. Am J Trop Med Hyg. 2015;93:18-23. http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.13-0663http://dx.org.doi:10.4269/ajtmh.13-0663
13. **Pérez-Ortiz NA, Prince WE, Tweeboom JM, Tocci N.** Prevalencia del dengue asintomático, por serología, en menores de 15 años del sector Santa Cruz, Puerto Cabello. Revista Electrónica de Portales Médicos.com, 2009. Fecha de consulta: 20 de octubre de 2015. Disponible en: http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articles/1415/1/Prevalencia-del-dengue-asintomatico-por-serologia-en-menores-de-15-anos-.html.
14. **Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH.** Economic impact of dengue illness in the Americas. Am J Trop Med Hyg. 2011;84:200-7. http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0503
15. **Focus Diagnostics.** Dengue virus serology testing. 2011. Fecha de consulta: 10 de abril de 2016. Disponible en: http://www.focusdx.com/pdfs/brochures/DXDENI0511_Dengue_Virus_Serology.pdf.
16. **Panbio Diagnostics.** Dengue IgM Capture ELISA.,2013. Fecha de consulta: 10 de abril de 2016. Disponible en: http://www.sekisuidiagnostics.com/writable/product_documents/files/ifu_01pe20_dengue_igm_capture_2013.pdf.
17. **SPSS Inc.** PASW Statistics for Windows. Versión 18.0. Chicago: SPSS Inc.; 2009.
18. **Navarrete J, Acevedo JA, Huerta E, Torres J, Gavaldón DG.** Prevalencia de anticuerpos contra dengue y leptospira en la población de Jáltipan, Veracruz. Salud Pública Mex. 2006;48:220-8.

19. **Mohammed H, Tomashek K, Stramer S, Hunsperger E.** Prevalence of anti-dengue immunoglobulin G antibodies among American Red Cross blood donors in Puerto Rico, 2006. Transfusion. 2012;52:1652-6. http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03492.x

20. **Duncombe J, Lau C, Weinstein P, Aaskov J, Rourke M, Grant R, *et al*.** Seroprevalence of dengue in American Samoa, 2010. Emerg Infect Dis. 2013;19:324-6. http://dx.doi.org/10.3201/eid1902.120464

21. **Restrepo BN, Arboleda M, Lopera T.** Estudio seroepidemiológico de dengue en la región del Urabá antioqueño, Colombia. Infectio. 2004;8:255-62.

22. **Ali A, Rehman HU, Nisar M, Rafique S, Ali S, Hussain A, *et al*.** Seroepidemiology of dengue fever in Khyber Pakhtunkhawa, Pakistan. Int J Infect Dis. 2013;17:518-23. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2013.01.007

23. **Hoyos A, Pérez A.** Prevalencia de infección reciente por dengue en San Mateo, Anzoátegui, Venezuela, 2007- 2008. Rev Cubana Hig Epidemiol. 2012;50:25-8.

Biomédica 2017;37:42-52
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3140

ARTÍCULO ORIGINAL

Diversidad de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) en Santander, Colombia: implicaciones epidemiológicas

Lyda Esteban[1,2], José Mauricio Montes[2], Víctor Manuel Angulo[1,3]

[1] Grupo CINTROP, Universidad Industrial de Santander, Piedecuesta, Colombia
[2] Posgrado en Entomología, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia
[3] Unión Temporal Red Chagas, Piedecuesta, Colombia

Introducción. Los triatominos domiciliados y silvestres constituyen un problema de impacto epidemiológico en el departamento de Santander, pues se han asociado recientemente con brotes agudos de la enfermedad de Chagas, por lo cual el análisis de su diversidad y variación temporal contribuye al conocimiento de su biología y ecología en una de las áreas más endémicas del país.
Objetivo. Analizar la diversidad de triatominos en dos regiones de Santander.
Materiales y métodos. Se analizó la información de la base de datos del Laboratorio de Entomología del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales de la Universidad Industrial de Santander (CINTROP-UIS), la cual contiene registros de triatominos en Santander. La información se separó en dos regiones, el Magdalena Medio y la zona andina, para cada una de las cuales se diseñaron curvas de acumulación de especies y de rango de abundancia, se calcularon los índices de diversidad y de igualdad, se analizó la colonización y se evaluó la variación temporal o persistencia de la comunidad.
Resultados. El 95 % de los triatominos provenía de la zona andina y, el 4,57 %, del Magdalena Medio, con nueve y diez especies, respectivamente. Se encontró mayor diversidad y riqueza en el Magdalena Medio en comparación con la zona andina. Las especies dominantes en la zona andina fueron *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*, mientras que en Magdalena Medio fueron *Rhodnius pallescens* y *Panstrongylus geniculatus*. La variación temporal mostró persistencia de las comunidades en el tiempo.
Conclusiones. Los resultados evidenciaron diferencias en la diversidad de las dos regiones, además del potencial de las especies silvestres para ocupar ecótopos artificiales. La intrusión de triatominos y la reciente incriminación de especies silvestres en la transmisión de *Trypanosoma cruzi*, indican la necesidad de un mayor conocimiento de la ecología de estos vectores para orientar las estrategias de control.

Palabras clave: Triatominae; enfermedad de Chagas; epidemiología; vectores de enfermedades; biodiversidad; Colombia.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3140

Diversity of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Santander, Colombia: Epidemiological implications

Introduction: Domestic and wild triatomines in the department of Santander have an epidemiological impact, as recently they have been linked to outbreaks of acute Chagas disease. The analysis of their diversity and temporal variation contributes to the understanding of their biology and ecology in one of the most endemic areas of the country.
Objectives: To analyze triatominae diversity in two regions of Santander.
Materials and methods: We analyzed the triatomine records for Santander contained in the CINTROP-UIS entomology lab database. We grouped the information for two regions: the Middle Magdalena area and the Andean region, and for each one we designed species accumulation and range-abundance curves, we calculated diversity and equality indices, and we analyzed colonization and temporal variation or persistence of the community.
Results: Ninety five percent of triatomines came from the Andean area and 4.57% from Magdalena Medio, with nine and ten species each. The dominant species in the Andean area were *Rhodnius prolixus*

Contribución de los autores:
Lyda Esteban: concepción del estudio, recopilación, análisis e interpretación de los datos
José Mauricio Montes: análisis e interpretación de los datos
Víctor Manuel Angulo: recopilación de los datos y revisión crítica
Todos los autores participaron en el diseño del estudio y la escritura del manuscrito.

and *Triatoma dimidiata* while in Magdalena Medio they were *Rhodnius pallescens* and *Panstrongylus geniculatus*. We found a greater diversity and richness in Middle Magdalena compared to the Andean area. The temporal variation showed persistence of communities over time.
Conclusions: Results revealed differences in the diversity of the two regions and the potential of wild species to occupy artificial ecotopes. Triatomines intrusion and the recent involvement of wild species in the transmission of *Trypanosoma cruzi* emphasize the need to further investigate the ecology of these vectors in order to guide population control strategies.

Key words. Triatominae; Chagas disease; epidemiology; disease vectors; biodiversity; Colombia.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3140

La enfermedad de Chagas, cuya principal vía de transmisión es la vectorial (1), es un problema de salud pública en Latinoamérica, ya que entre ocho y nueve millones de personas están infectadas en 21 países (2). En Colombia, se ha estimado que 437.960 habitantes se han infectado por esta vía (3). Sin embargo, la transmisión oral de *Trypanosoma cruzi,* es decir, por la contaminación de alimentos con heces de triatominos silvestres o con secreciones infectadas de reservorios (4,5), ha recibido especial atención en la última década en países como Brasil, Venezuela y Colombia (4-8), debido al incremento del número de casos (5,6), su aparición en zonas urbanas (5,7,8) y rurales (4,5,8-10), la ausencia de vectores domiciliados (4,5,8-10), y la elevada morbilidad y mortalidad (5,9).

Rhodnius prolixus, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma venosa* son las especies de triatominos con mayor importancia epidemiológica en Colombia por haberse encontrado en los domicilios humanos (11,12), aunque otras especies de los géneros *Rhodnius* y *Panstrongylus* con hábitos silvestres se han relacionado con brotes de transmisión oral de *T. cruzi* en regiones donde no se encuentran triatominos domiciliados (4,9).

Los términos “domiciliado” y “no domiciliado” describen el tipo de infestación de los triatominos en la vivienda humana; existen varias categorías para definirla, con niveles intermedios entre ellas (13-16). En este artículo nos acogeremos a la clasificación con la cual se describen los siguientes hábitos de las especies y poblaciones de triatominos: selváticos, intrusos, domiciliados y domésticos (15). Se espera que con la información recabada se formulen las recomendaciones que orienten las estrategias de prevención y control en las zonas analizadas.

El departamento de Santander presenta dos unidades fisiográficas denominadas valle medio del río Magdalena y zona andina en la Cordillera Oriental, ambas al occidente de su territorio. El departamento se ha considerado una de las zonas más endémicas de la enfermedad de Chagas debido a la presencia de *R. prolixus* doméstico en gran parte de su área, especialmente en la zona andina (17,18). Aunque la zona del valle medio del río Magdalena se ha caracterizado como de baja endemia por la ausencia de triatominos domiciliados, desde la década de los 90, Angulo, *et al*. (18), reportaron la infección humana en esta zona, así como la frecuente intrusión de triatominos silvestres en las viviendas, lo cual sugería la transmisión activa de *T. cruzi* y la necesidad de más estudios que permitieran analizar la situación epidemiológica en estas áreas (18,19).

En Santander se han reportado 14 especies de triatominos (Esteban L, Angulo VM. *Rhodnius colombiensis* Moreno, Galvão, Jurberg 1999 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) en el departamento de Santander. Resúmenes, XXXV Congreso de Socolen. Cali, 2008. p. 149) (11) , lo cual lo ubica como uno de los departamentos con mayor riqueza de especies; además, ocupa el primer lugar en cuanto al número de brotes agudos por transmisión oral de *T. cruzi* en el país (5,9), específicamente en los municipios de Lebrija, Bucaramanga, Piedecuesta, San Vicente y Girón, lugares reconocidos por su baja endemia (8,10). Esta nueva situación es de gran interés para el estudio de los vectores de la enfermedad de Chagas en esta región del país, pues, como ya se ha mencionado, el incremento de especies de triatominos con bajos niveles de domiciliación que participan en la transmisión de la infección de *T. cruzi* a los humanos, impone la necesidad de indagar sobre sus características bioecológicas

Correspondencia:
Lyda Esteban, Grupo CINTROP, Universidad Industrial de Santander, Km 2 sede vía El Refugio-Guatiguará, Piedecuesta, Santander, Colombia
Teléfono: (577) 634 4000, extensión 3526
lestebanar@hotmail.com

Recibido: 25/01/16; aceptado: 18/05/16

para, así, proponer medidas de control alternativas que tomen en cuenta el comportamiento de los triatominos silvestres.

Es por este motivo que se decidió analizar la biodiversidad de estos insectos en las dos zonas fisiográficas del departamento de Santander con base en los registros de las especies capturadas durante varios años contenidos en la base de datos del Laboratorio de Entomología del CINTROP-UIS, la cual ha mantenido un inventario de triatominos recolectados en varios municipios del departamento durante 13 años, aproximadamente.

Materiales y métodos

Se analizó la información contenida en la base de datos de los triatominos registrados en el Laboratorio de Entomología del CINTROP-UIS entre 1996 y 2008. La información incluye los siguientes registros: lugar (municipio y localidad), fecha de captura, número de triatominos recolectados, estados de desarrollo de los insectos, hábitat de recolección (silvestre, domicilio, peridomicilio) e identificación de la especie. Los datos correspondieron a 63 de los 83 municipios del departamento.

Área de estudio

La información contenida en la base de datos utilizada proviene de dos zonas determinadas por las dos unidades fisiográficas que componen el departamento de Santander. La primera es la zona andina, localizada en la Cordillera Oriental, la cual ocupa la mayor parte del departamento en dirección suroeste a noreste. Su relieve es quebrado y con pendientes fuertes de alturas superiores a los 3.000 metros sobre el nivel del mar; el promedio anual de lluvias es de 1.500 a 2.000 mm y las temperaturas alcanzan los 32 °C. El bosque húmedo premontano casi ha desaparecido y el área está atravesada de sur-oriente a nor-occidente por el cañón del río Chicamocha (figura 1).

La segunda es la zona del valle medio del río Magdalena, la cual está ubicada en el centro nororiental del país, entre las cordilleras Central y Oriental, en el corredor geográfico de la parte media del río Magdalena. Mide 34.610 km^2 (equivalente al 3 % del área nacional) (figura1). Geográficamente está compuesta por un relieve ondulado de topografía suave, con predominio del valle del río Magdalena. En la región se presentan zonas de vida de bosque seco tropical, con una temperatura promedio de 24 °C, y de bosque húmero tropical, la cual abarca, aproximadamente, el 80% de la región, con una temperatura media anual de 27,8 °C y un promedio de lluvias de 2.687 mm. Sus municipios están ubicados entre los 600 y los 800 msnm. La región se caracteriza por la presencia de cultivos de café y cacao, pastizales para la ganadería y extracción petrolera, y aún conserva remanentes de bosque primario y secundario (figura 1).

Base de datos

Los análisis se basaron en la información contenida en la base de datos de los triatominos registrados en el Laboratorio de Entomología del CINTROP-UIS entre los años 1996 y 2008 proveniente de 63 de los 83 municipios del departamento.

Una parte de los registros incluye los triatominos recolectados por la comunidad y remitidos durante los programas de vigilancia entomológica desarrollados por la Secretaría de Salud departamental y por algunos programas de salud municipales. Otros insectos fueron recolectados por investigadores del CINTROP. La base de datos tiene un total de 12.118 triatominos registrados recolectados en 3.648 viviendas de 63 municipios: 3.254 en viviendas de 54 municipios de la zona andina y 394 en viviendas de nueve municipios del Magdalena Medio (cuadro 1). Los insectos fueron identificados con claves taxonómicas (13,20).

Análisis de datos

Se calcularon curvas de acumulación de especies y estimadores de riqueza en las dos zonas. Las curvas de acumulación de especies permiten graficar cómo se van añadiendo especies a una comunidad a medida que se aumenta el número de individuos recolectados o el número de muestras. Mediante la distribución aleatoria de las muestras y de los individuos se consigue suavizar esta curva y obtener valores de dispersión (21). En su cálculo

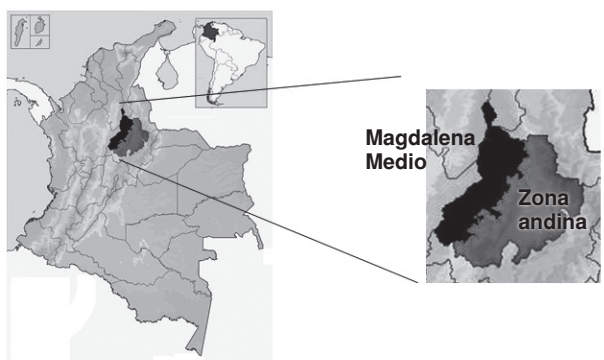


Figura 1. Mapa de las dos zonas estudiadas en el departamento de Santander
Fuente: https://commons.wikimedia.org/wiki/File: Colombia-deps-santander.svg

Cuadro 1. Triatominos recolectados en el departamento de Santander en el periodo comprendido entre 1996 y 2008

Especie	Zona andina							
	Ninfa I	Ninfa II	Ninfa III	Ninfa IV	Ninfa V	Hembras	Machos	Total
R. prolixus	879	707	1.107	935	1.294	451	848	6.221
T. dimidiata	228	198	409	605	1.136	612	1.316	4.504
P. geniculatus	64	0	0	6	4	49	255	378
R. pallescens	18	27	43	49	29	26	29	221
P. rufotuberculatus	0	0	0	0	0	4	3	7
T. maculata	14	0	3	11	10	15	44	97
E. cuspidatus	0	0	0	0	0	6	6	12
T. venosa	0	2	4	12	24	31	44	117
B. corredori	0	0	0	0	1	4	2	7
Especie	**Magdalena Medio**							
	Ninfa I	**Ninfa II**	**Ninfa III**	**Ninfa IV**	**Ninfa V**	**Hembras**	**Machos**	**Total**
R. prolixus	0	0	0	2	2	5	9	18
T. dimidiata	0	0	0	0	0	16	7	23
P. geniculatus	0	0	0	0	0	94	109	203
R. pallescens	10	4	36	30	29	79	83	271
P. rufotuberculatus	0	0	0	0	1	4	7	12
E. cuspidatus	0	0	0	1	1	6	1	9
T. venosa	0	0	0	0	1	4	6	11
R. colombiensis	0	0	0	0	0	2	0	2
P. humeralis	0	0	0	0	0	2	0	2
B. herreri	0	0	0	0	0	1	2	3

se utilizó el programa estadístico Estimates Win 8.00 (22). Con este programa se calcula tambien el estimador no paramétrico *jackknife* 2, el cual se utilizó con éxito en la estimación de la riqueza de las especies (21). La siguiente es la ecuación empleada:

$$Jackknife\ 2 = Sobs + \left[\frac{Q_1(2m-3)}{m} - \frac{Q_2(m-2)^2}{m(m-1)}\right],$$

donde *Sobs* corresponde a especies observadas, *m*, al número de muestras, *Q1*, al número de especies recolectadas solo una vez, y *Q2*, al número de especies recolectadas dos veces.

Se emplearon, asimismo, índices de diversidad, los cuales tienen la ventaja de obtener información valiosa sobre la estructura de la comunidad mediante un análisis sencillo, aunque deben analizarse e interpretarse con cuidado teniendo en cuenta las limitaciones de cada índice (23). Se estimaron los índices de riqueza de Margalef, Menhinick y el alfa de Fisher (α), los cuales dependen del número de especies que se encuentran en una comunidad (*s*) en relación con el número de especímenes o tamaño de la muestra (*n*) (23).

$$Índice\ de\ Margalef = \frac{s-1}{\ln(n)}$$

$$Índice\ de\ Menhinick = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$S = \alpha * ln\left(1 + \frac{n}{\alpha}\right)$$

También se estimó el índice de igualdad o equidad de Pielou (J), el cual se ve afectado por la distribución de la abundancia o número de especímenes en las especies presentes en la comunidad; este índice aumenta cuando hay una mejor distribución y, por ende, mayor diversidad (21).

$$J' = \frac{H'}{ln(S)}$$

Se utilizó también el índice de dominancia de Simpson (λ), el cual se define como la probabilidad de que, al recolectar dos individuos, los dos pertenezcan a la misma especie. Este índice aumenta a medida que una o unas pocas especies tienen una abundancia relativa alta (*pi*) y son más dominantes en la comunidad, por lo cual es inversamente proporcional a los otros índices de diversidad (21).

$$\lambda = \sum_{i=1}^{S} pi^2 \text{ donde } pi = \frac{ni}{N}$$

Por último, se empleó el índice de diversidad de Shannon-Wienner (*H'*), el cual se ve determinado tanto por la igualdad como por la riqueza; aunque es fácil de usar, su interpretación es limitada y debe complementarse con los índices de igualdad y de riqueza (23).

$$H' = \sum_{i=1}^{S} \left\{ \left(\frac{ni}{n}\right) ln \left(\frac{ni}{n}\right) \right\}$$

Se determinó si existía diferencia entre los valores obtenidos en las dos regiones por el método de *bootstrapping*, técnica de "remuestreo" que toma aleatoriamente un número considerable de muestras de un conjunto total de datos y genera una distribución que permite hacer inferencias estadísticas (24). Para este análisis se utilizó el programa Past, versión 1.79 (25).

Además de los índices de diversidad, se elaboraron curvas de rango y abundancia para los triatominos de las dos regiones estudiadas. Estas gráficas son útiles para comparar la diversidad, la riqueza y la dominancia de varias comunidades (21).

En cuanto a la colonización, los resultados se expresaron en porcentajes calculados a partir de los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2002: número de viviendas con ninfas o huevos de triatominos sobre número de viviendas con triatominos x 100. No se incluyeron las ninfas de I instar debido a que muchas nacen en el frasco después de recolectar hembras fecundadas.

Persistencia de la comunidad

Ante la ambigüedad de términos como constancia y estabilidad, la "persistencia" se ha definido como la de una comunidad en una escala exclusivamente temporal (26,27). El análisis de la persistencia de la comunidad se hizo separadamente para las dos regiones. Para hacerlo se agruparon los datos en tres periodos con números de capturas similares para cada región, con el fin de hacerlos comparables. En el caso de la zona andina, el primer periodo fue de 1996 a 2002, el segundo correspondió al año 2003 y, el tercero, al periodo de 2004 a 2008. En el caso del Magdalena Medio, el primer periodo fue el año 1997, el segundo, al periodo de 1998 a 2004 y, el tercero, al periodo de 2006 a 2008. Para analizar la información se aplicó la metodología de Rahel (26), con la cual se mide la persistencia en tres niveles. El primero es la abundancia absoluta de las especies, para lo cual se hace una tabla de contingencia con el fin de comprobar si existe dependencia de las abundancias con respecto a los muestreos a lo largo del tiempo, En el segundo nivel se evalúan los rangos de abundancia mediante el coeficiente de concordancia de Kendall (W), con el cual se determina si las especies conservan el rango de abundancia en el tiempo, es decir que las dominantes se mantienen como dominantes. El tercer nivel de medición corresponde a la presencia o ausencia de especies en el tiempo, la cual se mide mediante el índice de similitud de Jaccard, resultado de dividir las especies compartidas (*C*) entre dos muestras, *A y B,* por las especies totales en las dos muestras (A+B–C).

$$J' = \frac{C}{A + B - C}$$

De esta manera, los valores cercanos a uno indican gran similitud y, los cercanos a cero, ninguna. Se promediaron los resultados de cada par de períodos para evaluar la persistencia de la comunidad (26).

Resultados

Análisis de la diversidad

Curva de acumulación de especies. En el Magdalena Medio la curva de acumulación de especies no alcanzó la asíntota, por lo cual es predecible que se recolecten más de las diez especies registradas en el momento. En la zona andina, en cambio, la curva logró la asíntota. El estimador de riqueza *jackknife* 2 mostró que no se acumularían más especies en esta zona, debido a que no se habían registrado especies con una o dos muestras solamente, en tanto que en el Magdalena Medio el cálculo predijo que aún faltaban tres especies por recolectar (figura 2).

Índices de diversidad. Los índices de dominancia de Simpson y el de diversidad de Shannon mostraron diferencias significativas entre las dos regiones, aunque fue mayor en el Magdalena Medio. Los índices de riqueza de Margalef, Menhinick y el

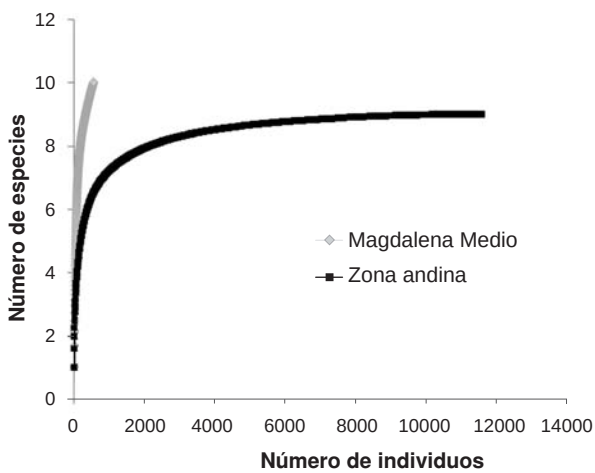


Figura 2. Curvas de acumulación de las especies de triatominos en Santander. **A:** Zona andina. **B:** Magdalena Medio. (± $CI_{95\%}$). Se utilizó el número de individuos registrados entre 1996 y 2008.

alfa de Fisher, mostraron diferencias significativas entre las dos regiones, resultado predecible, ya que en el Magdalena Medio se recolectaron menos individuos y más especies. Por el contrario, el índice de igualdad de Pielou no mostró diferencias significativas (p=0,37) (cuadro 2).

Curvas de rango y abundancia. Las curvas de rango y abundancia fueron similares para las dos regiones, con dos especies claramente dominantes: en la zona Andina, *R. prolixus,* con el 53,8 % de la abundancia y *T. dimidiata* con el 38,9 %, y en el Magdalena Medio, *R. pallescens* con el 48,9 % y *P. geniculatus* con el 36,6 % (figura 3).

Colonización. En la zona andina se encontró colonización domiciliaria de las siguientes especies: *R. prolixus* (71,25 %), *T. dimidiata* (46,3 %), *R. pallescens* (41,6%), *T. venosa* (25,5 %), *Triatoma maculata* (19,4 %) y *P. geniculatus* (2,4 %); de *Belminus corredori* se registró solo una ninfa V instar en una única vivienda. En el Magdalena Medio se registró colonización domiciliaria de las siguientes especies: *R. pallescens* (19,65 %), *R. prolixus* (15,4 %), *E. cuspidatus* (14,3 %), *T. venosa* (10 %) y *Panstrongylus rufotuberculatus* (9,1 %).

Cuadro 2. Índices de diversidad, riqueza e igualdad de la comunidad de triatominos en dos zonas del departamento de Santander

	Zona andina	Magdalena Medio	*Bootstrap* (p)
Especies	9	10	0,997
Individuos	11.564	554	<0,001
Diversidad			
Shannon H	0,9909	1,258	<0,001
Simpson	0,443	0,376	<0,001
Alfa de Fisher	0,9575	1,733	<0,001
Riqueza			
Menhinick	0,08369	0,4249	0,002
Margalef	0,8551	1,425	<0,001
Igualdad			
Jaccard J	0,451	0,5462	0,37

p: probabilidad menor de 5 %

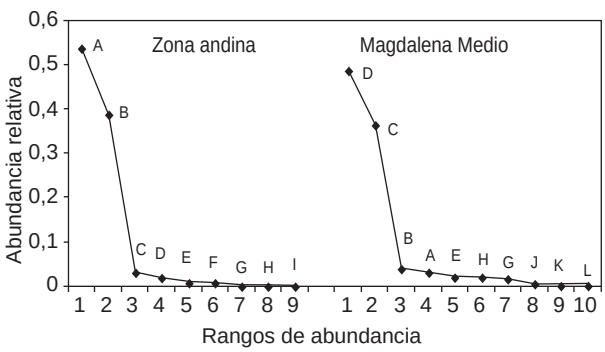


Figura 3. Curvas de rango y abundancia de triatominos en dos zonas del departamento de Santander
A: *Rhodnius prolixus*, B: *Triatoma dimidiata*, C: *Panstrongylus geniculatus*, D: *Rhodnius pallescens*, E: *Triatoma venosa*, F: *Triatoma maculata*, G: *Eratyrus cuspidatus*, H: *Panstrongylus rufotuberculatus*, I: *Belminus corredori*, J: *Belminus herreri*, K: *Panstrongylus humeralis*, L: *Rhodnius colombiensis*

Variación temporal o persistencia

Los resultados evidenciaron cambios de la estructura de la comunidad a lo largo del tiempo, aunque se mantuvieron las mismas especies (figura 4). Los índices de similitud de Jaccard mostraron que no hubo diferencias en la composición de la comunidad, con un valor de 0,68 para la zona andina y de 0,84 para el Magdalena Medio, en tanto que las tablas de contingencia mostraron dependencia de los períodos con las abundancias en las dos regiones (χ^2=654, p=0,0001 para la zona andina y p=0,0045; χ^2=31,144 para el Magdalena Medio), lo cual implica cambios en las abundancias a través del tiempo. En cuanto a la correlación de rangos de Kendall (W´), su valor fue significativo para las dos regiones (W´=0,88; p=0,0068 en la

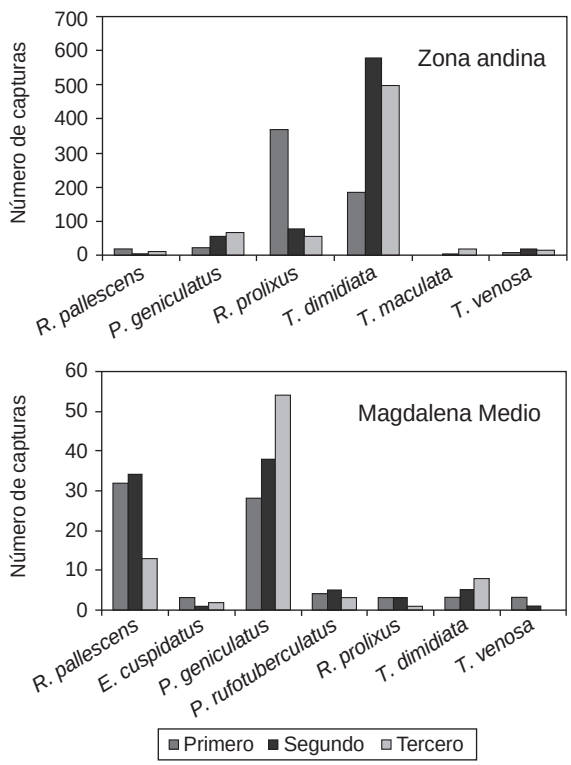


Figura 4. Variación temporal o persistencia de triatominos. Se ilustra la presencia de las especies de triatominos más abundantes en tres períodos, con número de capturas similares en dos regiones del departamento.

zona andina y W´=0,9; p=0,0057 en el Magdalena Medio), lo cual evidencia una tendencia hacia la persistencia de la comunidad.

Discusión

De las 27 especies de triatominos reportadas en el país (11,12,28-30), los departamentos de Santander, Meta y Cundinamarca comparten la mayor biodiversidad con 14, 16 y 13 especies, respectivamente. Estos departamentos son heterogéneos geográficamente y tienen todos los pisos térmicos; sin embargo, en Santander podría haber un mayor número de especies debido a que los estimadores de riqueza predijeron la presencia de más especies.

La diferencia en la diversidad de triatominos en las dos zonas estudiadas puede deberse a la altitud, pues este factor es uno de los más importantes en la distribución de los triatominos (11), lo cual explicaría por qué hay mayor diversidad en el Magdalena Medio, cuyas altitudes son más bajas que en la zona andina.

Otro factor que puede determinar la mayor biodiversidad en esta última zona, sería la mayor conservación de fragmentos de bosque y de hábitats naturales en comparación con la zona andina. Hay que tener en cuenta que, aunque no se encontró infestación de triatominos domiciliarios en las zonas bajas (600-800 msnm), la cercanía de fragmentos de bosque primario conservado y de sistemas agroforestales con bosque secundario abundante podría favorecer la presencia de estos insectos en las viviendas de la región.

En cuanto a la persistencia y el rango de abundancia de las especies, se mantuvieron a lo largo de los tres periodos en las dos regiones, mientras que las abundancias totales de las especies cambiaron. Este patrón de persistencia es el más común en otro tipo de comunidades (26). Según este modelo, los eventos ambientales que generan cambios en la abundancia de los triatominos afectarían la abundancia total de las especies de una comunidad sin cambiar las especies que la componen ni las especies dominantes (figura 4).

Las dos especies que ocuparon el tercer y el cuarto puesto en el rango de abundancias en Magdalena Medio fueron *R. prolixus* y *T. dimidiata*, las cuales fueron dominantes en la zona andina. Del mismo modo, las que ocupan el tercer y el cuarto puesto allí, es decir, *R. pallescens* y *P. geniculatus*, fueron las dominantes en el Magdalena Medio. Es importante tener en cuenta que *R. prolixus* y *T. dimidiata* son las especies con mayor distribución y riesgo de transmisión del mal de Chagas en Colombia, mientras que *R. pallescens* y *P. geniculatus* se encuentran casi exclusivamente en ambientes silvestres (11).

Rhodnius prolixus es el vector más importante de la enfermedad de Chagas en Colombia (11) y su colonización de los domicilios humanos fue alta en la zona andina, en donde el hábitat “dómestico” es exclusivo. En los estudios genéticos en poblaciones del centro del país, se ha demostrado que son homogéneas (31) y, por lo tanto, se pueden someter a control químico, tanto así que diez municipios del país han sido certificados como libres de la transmisión de *T. cruzi* por este vector, entre ellos, Guadalupe y Oiba, ubicados en la zona andina de Santander. Por el contrario, en el Magdalena Medio la información sobre esta especie es escasa y solo se conoce su distribución en algunos municipios (18). Nuestro equipo reportó el hallazgo de adultos en el domicilio de cinco municipios, pero en dos de ellos, Bolívar y La Paz, solo se reportaron ninfas. En el estudio parasitológico de un ejemplar recolectado en el municipio de San Vicente de Chucurí en esta zona, no se reportó infección por *Trypanosoma* spp. (29), lo cual pone de manifiesto la necesidad de investigar más su biología y distribución para, así, valorar el riesgo actual de infección entre los moradores de esta zona.

En cuanto a *T. dimidiata,* se recolectaron adultos y ninfas en las viviendas de 24 municipios de la zona andina y en algunos se registraron infestaciones simultáneas con *R. prolixus*, especie esta que se ha reportado infestando viviendas con *P. geniculatus* y *T. maculata*, lo cual podría ser el efecto de la intervención humana en el ambiente, es decir, que la perturbación de los ambientes selváticos lleva a que los triatominos silvestres o peridomiciliarios, poco habituales en zonas urbanas o suburbanas, tengan que adaptarse a los ambientes domésticos (32). En este sentido, cabe anotar que la zona andina en Colombia es el área más poblada del país y la acción antrópica en el paisaje es evidente en la destrucción de bosques y refugios y reservorios de triatominos, debido a la agricultura extensiva y los numerosos asentamientos humanos, los cuales podrían encontrarse en un gran riesgo de infección por *T. cruzi*, ya que la especie se ha encontrado en hábitats domiciliarios. Esta especie se ha reportado especialmente en hábitats peridomiciliarios en acúmulos de objetos inservibles, sitios de descanso de animales domésticos y hábitats silvestres (33,34);

también, se ha reportado la reinfestación de las viviendas después de control químico (35), por lo cual sigue siendo un reto para los programas de control vectorial.

Por el contrario, en el Magdalena Medio solo se registraron adultos en los municipios de Bolívar, San Vicente de Chucurí y Carmen de Chucurí, lo cual sugiere que esta especie es intrusiva en las viviendas. Dicho comportamiento involucra especies selváticas, cuyos adultos incursionan en las viviendas atraídos por la luz o llegan transportados de forma pasiva, pues no se ha encontrado evidencia de colonización (huevos, exuvias, ninfas) (14). Los reportes del lugar de captura de esta especie mencionan la casa “elba” (lugar donde se asolean el cacao y el café, la cual tiene techo corredizo), los bombillos y las paredes. Por todo ello es indispensable ahondar en el conocimiento de la biología de esta población.

Las curvas de rango y abundancia mostraron que *R. pallescens* es la cuarta especie en abundancia en la zona andina. Se hallaron adultos y ninfas de todos los estadios juveniles en el domicilio y en área aledañas, principalmente en gallineros. En el Magdalena Medio esta fue la especie dominante y se registró en nueve municipios, tanto en el domicilio como en el peridomicilio; todas las ninfas se recolectaron en el domicilio; 23 de 117 viviendas se encontraron colonizadas por esta especie, lo cual refleja el riesgo de la población y el potencial de domiciliación de esta especie en esta zona del departamento. Esta especie se ha relacionado con los brotes de la enfermedad de Chagas agudo por transmisión oral ocurridos en los últimos años (9), por lo tanto, es prioritario conocer el estado actual de la infestación domiciliaria en la región y proponer medidas preventivas.

En cuanto a *P. geniculatus*, esta fue la tercera especie más abundante en la zona andina; el hallazgo de adultos, ninfas IV y V instar en el domicilio y el peridomicilio podría sugerir un desplazamiento desde hábitats silvestres cercanos más que un evento de colonización. Su cercanía al domicilio se ha asociado con la disminución de la cobertura vegetal, la distancia al bosque y las luces encendidas (36). En el Magdalena Medio la ausencia de ninfas en el domicilio podría deberse a que el hábitat natural está más conservado y hay menos bosques intervenidos, lo cual les permite mantener sus refugios. Ante el riesgo de intrusión de esta especie en los domicilios, es indispensable continuar con su vigilancia entomológica en el departamento, debido al riesgo de enfermedad de Chagas aguda por transmisión oral, en la cual se ha implicado esta especie (36).

En lo relacionado con *T. maculata*, esta especie se considera una de las cuatro de mayor riesgo de transmisión en el país, ya que frecuentemente se reporta en el domicilio y el peridomicilio (11,37). Se ha demostrado su potencial de domiciliación en Venezuela (32) y se ha sugerido su rapidez de adaptación a ecótopos artificiales (37); el hallazgo de ninfas de varios instares indica que son necesarios estudios para evaluar su potencial de domiciliación. En la zona norte de Colombia se ha reportado (11,37) en bosques xerofíticos, tropicales y subtropicales (38). En este estudio se registraron adultos y ninfas en seis municipios de la zona andina (Florián, Capitanejo, San José de Miranda, Macaravita, Mogotes, Molagavita), en una región caracterizada por su relieve quebrado y vegetación cacticiforme, arbustos achaparrados, formas herbáceas estacionales y formaciones xerofíticas, clima templado a cálido y alturas que van hasta los 2.000 msnm. En el Magdalena Medio no se la encontró, quizá por las diferencias en las condiciones del clima, sobre todo en la humedad.

En lo concerniente a *T. venosa*, se registraron adultos y ninfas en el domicilio y el peridomicilio de 14 municipios en la zona andina, mientras que en el Magdalena Medio se halló en el domicilio de cuatro municipios, lo que la sitúa en el quinto lugar en abundancia en las dos zonas estudiadas. En trabajos de campo realizados por nuestro grupo en la zona andina, se han hallado adultos y ninfas en lugares donde duermen los perros (observación personal). Por otra parte, la información sobre su biología y dispersión es limitada.

Eratyrus cuspidatus se ha reportado en 15 departamentos (11,29) y se ha recolectado naturalmente en palmas de *Attalea butyracea* (19); ocasionalmente, invade viviendas en el centro y norte del país. En el 2009, la especie fue incriminada en la transmisión de *T. cruzi* a los humanos en el departamento del Magdalena (39). En este estudio se reportó infestando el domicilio y peridomicilio en los municipios de Bolívar, El Carmen de Chucurí y San Vicente de Chucurí en el Magdalena Medio, y solo una de ocho viviendas estaba infestada con ninfas. Se recolectaron más hembras que machos (seis hembras y un macho), lo que sugiere que los machos tienen mayor necesidad de alimentarse con sangre que las hembras.

P. rufotuberculatus está ampliamente distribuida en Centroamérica y el norte de Suramérica (13). En Colombia se ha reportado en 12 departamentos (11,29). Es una especie con amplio rango climático y altitudinal, y se la ha hallado frecuentemente en viviendas de varias localidades en Bolivia, donde el reporte de ninfas y adultos en una vivienda demostró que puede colonizar estructuras domésticas (40). En el presente estudio se registró en el domicilio y el peridomicilio (gallinero) en diez municipios, en tanto que solo una ninfa V instar se halló en el Magdalena Medio, pero su lugar de captura no se registró.

Dos hembras de *Panstrongylus humeralis* se hallaron en el municipio del Carmen de Chucurí, en el Magdalena Medio, una en 1997 y la otra en 2008, lo cual sugiere que se trata de una especie rara. En el país solo se ha encontrado en dos municipios de Santander (18), en tres municipios del departamento de Antioquia (11,19) y en nueve municipios del departamento del Meta (27). Aunque es una especie silvestre, se ha encontrado en el domicilio y el peridomicilio, y en zonas urbanas de dos municipios (29). Su biología es desconocida.

Belminus corredori se recolectó en los años 2002 a 2004 formando colonias domiciliarias en una vivienda de la vereda Puente Tierra del municipio de San Gil en la zona andina. Esta especie, descrita en el 2006 (12), es endémica del país y no se ha demostrado su potencial como vector de *T. cruzi*.

Belminus herreri se halló en una vivienda de la vereda Los Aljibes del municipio del Carmen de Chucurí; previamente se había reportado en este municipio y en San Vicente de Chucurí (18,41), así como en viviendas del municipio de San Martín, departamento del Cesar (42). Es notable su preferencia por ocupar áreas con altitudes entre los 400 y los 800 msnm.

Rhodnius colombiensis es una especie silvestre ampliamente distribuida en los valles interandinos a lo largo del río Magdalena, donde se la considera un vector importante en la transmisión de *T. cruzi*; su prevalencia como vector de *T. cruzi* es de 45 % (43). En este estudio se recolectó en los municipios de La Paz y San Vicente de Chucurí en el Magdalena Medio. Adultos y ninfas de esta especie se habían descrito infestando viviendas en la región central del país (43) y en gallineros en el municipio de La Paz (Esteban L, Angulo VM. *Rhodnius colombiensis* Moreno, Galvão, Jurberg 1999 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) en el departamento de Santander. Resúmenes, XXXV Congreso de Socolen. Cali; 2008. p. 149). Esta situación genera un gran interés debido al potencial de infección por transmisión oral, pues esta especie invade las viviendas (43). Se deben hacer estudios entomológicos para analizar si existe transmisión de *T. cruzi* en estos municipios, pues allí la especie podría estar incriminada.

En el presente trabajo se evidenció una gran diversidad de especies de triatominos en Santander, en comparación con otros estudios (32,44), lo cual deja ver la complejidad epidemiológica debido al número de especies recolectadas en viviendas y la colonización domiciliaria. Además de la dominancia y colonización domiciliaria en la zona andina de especies como *R. prolixus* y *T. dimidiata* (controladas, en el caso de *R. prolixus*), se ha demostrado el potencial de las especies silvestres para ocupar ecótopos artificiales construidos por el hombre, como son las viviendas. Además de *R. pallescens* y *P. geniculatus*, otras especies, como *E. cuspidatus* y *P. humeralis,* podrían ser candidatas potenciales en la transmisión vectorial u oral de *T. cruzi.* En el Meta se ha reportado la segunda de estas especies en 20 localidades de nueve municipios, incluidos hábitats domiciliarios y peridomiciliarios de dos zonas urbanas (29), así como de *P. rufotuberculatus* con el hallazgo de adultos en el domicilio. Es importante destacar que ya se ha demostrado la incriminación de *E. cuspidatus* en la transmisión de *T. cruzi* al hombre.

La intrusión de triatominos silvestres en domicilios, que se pudo comprobar en este estudio, así como la incriminación de especies como *P. geniculatus*, *R. pallescens* y *E. cuspidastus* en la transmisión de *T. cruzi*, indican que son necesarios un mayor conocimiento sobre la ecología de estos potenciales vectores y la adopción de otras estrategias de control diferentes de las tradicionales. Es prioritario, asimismo, continuar con la vigilancia entomológica y serológica, y establecer un sistema de alerta temprana para detectar y tratar casos agudos de la enfermedad, especialmente en aquellas áreas donde se observó la intrusión de estas especies silvestres. Por otro lado, la persistencia de las especies en el tiempo y la predicción de nuevas apariciones alertan sobre la necesidad de actualizar el estado de la infestación en el departamento para su mejor control.

Agradecimientos

A los profesionales del laboratorio de entomología del CINTROP-UIS.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no existe conflicto de intereses.

Financiación

Secretaría de Salud de Santander, Colciencias, proyecto código 3256-0418067 TDR/OMS.

Referencias

1. **World Health Organization.** Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leihsmaniasis. World Health Organ Tech Rep Ser. 2012;975:1-100.
2. **World Health Organization.** Chagas diseases (American Trypanosomiasis). Fact Sheet No 340. Geneve: WHO; 2013.
3. **World Health Organization.** Chagas disease in Latin America: An epidemiological update based on 2010 estimates. Wkly Epidemiol Rec. 20156;90:33-44.
4. **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
5. **Díaz ML, González CI.** Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. Rev Univ Ind Santander Salud. 2014;46:177-88.
6. **Coura JR, Junqueira AC.** Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107:145-54. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000200001
7. **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
8. **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
9. **Soto H, Tibaduiza T, Montilla M, Triana O, Suárez DC, Torres M**, ***et al.*** Investigación de vectores y reservorios en brote de Chagas agudo por posible transmisión oral en Aguachica, Cesar, Colombia. Cad Saude Publica. 2014;30:746-56. http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00024013
10. **Hernández L, Ramírez A, Cucunubá Z, Zambrano P.** Brote de Chagas agudo en Lebrija, Santander, 2008. Revista del Observatorio de Salud Pública de Santander. 2009;4:28-36.
11. **Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D.** Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. Biomédica. 2007;27(Supl.1):143-62. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.258
12. **Galvão C, Angulo V.** *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. Zootaxa. 2006;1241:61-8.
13. **Lent H, Wygodzinsky P.** Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. Bull Amer Mus Nat His. 1979;163:125-520.
14. **Waleckx W, Gourbière S, Dumonteil E.** Intrusive versus domiciliated triatomines and the challenge of adapting vector control practices against Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110:324-38. http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760140409
15. **Noireau F, Dujardin JP.** Biology of Triatominae. In: Telleria J, Tibayranc M, editors. American tripanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research. First edition. Burligton: Elsevier; 2010. p.149-64.
16. **Zeledón R.** Vectores de la enfermedad de Chagas y sus características ecofisiológicas. Interciencia. 1983;6:384-95.
17. **Corredor A, Santacruz MM, Páez S, Guatame LA**. Distribución de los triatominos domiciliarios en Colombia. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 1990. p. 1-144.
18. **Angulo V, Gutiérrez R, Rubio I, Joya M, Arismendi M, Esteban L, *et al*.** Triatomineos domiciliados y silvestres: impacto en la transmisión de la enfermedad de Chagas en Santander. En: Angulo VM, editor. Control y manejo de la tripanosomiasis americana. Bucaramanga: Gráficas Trijaimes; 1999. p. 72-6.
19. **Moreno J**. Estudios epidemiológicos sobre la enfermedad de Chagas en algunas regiones de Colombia. En: Guhl F, editor. Genética poblacional de triatomineos aplicada al control vectorial de la enfermedad de Chagas. Santafé de Bogotá: Corcas Editores Ltda.; 1997. p. 35-41.
20. **Carcavallo RU, Galíndez I, Jurberg J, Galvão C, Lent H.** Pictorial keys for tribes, genera and species of the subfamily Triatominae. In: Carcavallo RU, Galíndez I, Jurberg J, Galvão C, Lent H, editors. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz; 1997. p. 107-244.
21. **Magurran AE.** Ecological diversity and its measurement. New Jersey: Princeton University Press; 1988. p.179.
22. **Colwell RK**. EstimateS: Statistical Estimation of Species Richness and Shared Species from Samples (Software and User´s Guide). Versión 5.01. Fecha de consulta: 24 de abril de 2016. Disponible en: http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates
23. **Ludwig JA, Reynolds JF.** Statistical ecology. A primer on methods and computing. New York: John Wiley & Sons Inc; 1988. p. 341.
24. **Efron B, Tibshirani RJ.** Introduction to the bootstrap. Washington, D. C.: Chapman & Hall/CRC; 1993. p. 456.
25. **Hamer O, Harper DA, Ryan PD.** Past-Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Fecha de consulta: 14 de noviembre de 2008. Disponible en: www.uv.es/~pardomv/pe/2001_1/past/pastprog/past
26. **Rahel FJ.** The hierarchical nature of community persistence: A problem of scale. Amer Nat.1990;136:328-44.
27. **Grimm V, Wissel C.** Babel, or the ecological stability discussions: An inventory and analysis of terminology and a guide for avoiding confusion. Oecologia. 1997;109:323-34. http://dx.doi.org/10.1007/s004420050090
28. **Sandoval CM, Pabón E, Jurberg J, Galvão C.** *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian northeast, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Zootaxa.2007;1443:55-64.
29. **Parra GJ, Flórez M, Angulo VM.** Vigilancia de triatominae (Hemiptera: Reduviidae) en Colombia. 1ª edición. Bogotá, D.C.: Editorial Sic Ltda.; 2015. p. 127.

30. **Abad-Franch F, Pavan MG, Jaramillo-ON, Palomeque FS, Dale C, Chaverra D, *et al*.** *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(Supl. 1):92-9. http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276130434

31. **López DC, Jaramillo C, Guhl F.** Estructura poblacional y variabilidad genética de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) procedentes de diferentes áreas geográficas de Colombia. Biomédica. 2007;27(Supl.1):28-39. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.246

32. **García-Jordán N, Berrizbeitia M, Concepción JL, Aldana E, Cáceres A, Quiñones W.** Estudio entomológico de vectores transmisores de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural del estado Sucre, Venezuela. Biomédica. 2015;35:247-57. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2390

33. **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;100:607-12. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000600002

34. **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

35. **Angulo VM.** Ensayo de estrategias de control y vigilancia de *Triatoma dimidiata*, en Colombia. 2005. En Guhl F: Primer taller internacional sobre control de la enfermedad de Chagas. Bogotá, D.C.: Universidad de los Andes; 2005. p. 89-102.

36. **Reyes-Lugo M, Rodríguez-Acosta A.** Domiciliation of the sylvatic Chagas disease vector *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811 (Triatominae: Reduviidae) in Venezuela. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000;94:508.

37. **Cortés LA, Suárez HA.** Triatominos (Reduviidae: Triatominae) en un foco de enfermedad de Chagas en Talaigua Nuevo (Bolívar, Colombia). Biomédica. 2005;25:568-74. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v25i4.1383

38. **De Casas S, Carcavallo R, Galíndez I, Burgos J.** Bioclimatic factors and zones of life. In: Carcavallo RU, Galíndez-Girón I, Jurberg J, Lent H, editors. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Río de Janeiro: Fiocruz; 1999. p. 747-92.

39. **Dib J, Barnabe C, Tibayrenc M, Triana O.** Incrimination of *Eratyrus cuspidatus* (Stal) in transmission of Chagas' disease by molecular epidemiology analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted area in the north of Colombia. Acta Trop. 2009;3:237-42. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.05.004

40. **Noireau F, Bosseno MF, Vargas F, Breniere SF.** Apparent trend to domesticity observed in *Panstrongyus rufotuberculatus* Champion, 1899 (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia. Res Rev Parasitol. 1994;54:263-4.

41. **Sandoval CM, Joya MI, Gutiérrez R, Angulo VM.** Clepto-haematophagy of the triatomine bug *Belminus herreri*. Med Vet Entomol. 2000;14:100-1. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00210.x

42. **Sandoval CM, Duarte R, Gutiérrez R, Rocha DS, Angulo VM, Esteban L, *et al.*** Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99:137-40. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762004000200004

43. **Arévalo A, Carranza JC, Ghul F, Vallejo GA.** Patrones electroforéticos de hemoproteínas salivares (nitroforinas) de *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Biomédica. 2007;27(Supl.1):137-42. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.257

44. **Cantillo-Barraza O, Gómez-Palacio A, Salazar D, Mejía-Jaramillo AM, Calle J, Triana O.** Distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (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

Biomédica 2017;37:53-61
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.2915

ARTÍCULO ORIGINAL

Perfil clínico y demográfico y factores de riesgo frente a la infección por *Clostridium difficile*

Carlos Carvajal[1], Carlos Pacheco[1], Fabián Jaimes[1,2,3]

[1] Departamento de Cuidado Crítico, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia
[2] Unidad de Investigaciones, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia
[3] Departamento de Medicina Interna, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. La enfermedad asociada a *Clostridium difficile* es la principal causa de diarrea infecciosa adquirida en el hospital; su creciente incidencia, las menores tasas de respuesta al tratamiento inicial y la mayor tasa de recaídas han incrementado la carga de la enfermedad.
Objetivo. Determinar las características clínicas de los pacientes hospitalizados con enfermedad asociada a *C. difficile*.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio de casos anidado en una cohorte. Se revisaron las historias clínicas de pacientes con diarrea iniciada durante su hospitalización a quienes se les había practicado la prueba de detección de la toxina A-B de *C. difficile*, entre febrero de 2010 y febrero de 2012. Se definió como caso al paciente hospitalizado con diarrea y prueba de *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA) positiva para la toxina y, como control, a aquel con resultado negativo para la toxina. Se recolectaron los datos demográficos y clínicos, así como la información sobre los factores asociados, la estancia hospitalaria, el tratamiento y las complicaciones.
Resultados. Durante el periodo de seguimiento se recolectaron datos de 123 pacientes, de los cuales 30 fueron positivos para la toxina. La edad media en la población de estudio fue de 49 años y el 60 % correspondía a hombres. Los síntomas predominantes fueron el dolor abdominal (35 %) y la fiebre (34 %). Las principales complicaciones fueron la alteración electrolítica y la sepsis grave asociada con disfunción renal. La mortalidad total fue de 13 % y los factores independientes asociados con la aparición de la infección fueron el uso de inhibidores de la bomba de protones y la cirugía gastrointestinal previa.
Conclusiones. El uso de inhibidores de la bomba de protonesy la cirugía gastrointestinal previa fueron factores asociados con la infección por *C. difficile*.

Palabras clave: *Clostridium difficile*; epidemiología; disentería; antibacterianos; factores de riesgo; infección hospitalaria.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.2915

Clinical and demographic profile and risk factors for *Clostridium difficile* infection

Introduction: *Clostridium difficile* infection is the leading cause of nosocomial infectious diarrhea. The increasing incidence added to a lower rate of response to the initial treatment and higher rates of relapse has generated a higher burden of the disease.
Objective: To determine the clinical characteristics of hospitalized patients with *C. difficile* infection.
Materials and methods: We made a nested case-cohort study. We reviewed medical records of the patients with nosocomial diarrhea for whom an assay for toxin A-B of *C. difficile* had been requested from February, 2010, to February, 2012. We defined case as a patient with diarrhea and a positive assay for the toxin, and control as those patients with a negative assay for the toxin. We collected data on demographic and clinical characteristics, risk factors, hospital length of stay, treatment, and complications.
Results: We collected data from 123 patients during the follow-up period, 30 of whom were positive for the toxin. Mean age in the study population was 49 years and 60% were men. The main symptoms were abdominal pain (35%) and fever (34%). The principal complications were electrolytic alteration and severe sepsis with secondary acute kidney injury. Mortality was 13% and independent factors associated to the appearance of the infection were the use of proton pump inhibitors and previous gastrointestinal tract surgery.
Conclusions: The use of proton pump inhibitors and previous gastrointestinal tract surgery were factors associated to *C. difficile* infection.

Key words: *Clostridium difficile*; epidemiology; dysentery; anti-bacterial agents; risk factors; cross infection.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.2915

Contribución de los autores:
Todos los autores participaron en igual medida en todos los aspectos del estudio y la redacción del manuscrito.

Clostridium difficile es un bacilo Gram positivo anaerobio, formador de esporas, que usualmente se propaga por vía fecal-oral. Hace cuatro décadas se determinó su papel como un agente etiológico de diarrea asociada al uso de antibióticos y de colitis pseudomembranosa (1). La enfermedad asociada a *C. difficile* es la principal causa de diarrea de origen infeccioso en los hospitales y es la causa de hasta 30 % de la diarrea asociada a antibióticos (2).

La frecuencia y la gravedad de la infección por *C. difficile* han aumentado en los últimos años, con una incidencia reportada en Canadá de 22,5 casos por 1.000 hospitalizaciones (3) y una mortalidad atribuible en Norteamérica que va desde 1,5 hasta 25 % (3-6). Sumado al incremento en los costos directos e indirectos de atención de la enfermedad (alcanzan hasta USD$ 3,2 billones al año en Estados Unidos) (5), estas características han convertido la enfermedad en un problema de salud en los hospitales (6).

La enfermedad asociada a *C. difficile* se define como un cuadro de diarrea de inicio agudo y de causa no aparente en pacientes con presencia confirmada de *C. difficile* toxigénico o de su toxina (7). Los síntomas mas frecuentes son la diarrea, el dolor abdominal, la distensión abdominal y la fiebre. El espectro de la enfermedad es amplio y abarca desde los portadores asintomáticos hasta aquellos víctimas de episodios fulminantes asociados a colitis pseudomembranosa y megacolon tóxico.

Son múltiples los factores de riesgo, pero los más importantes son el uso previo de antibióticos (8,9) y la exposición al germen (7). Además, se han reconocido otros factores asociados, como la edad mayor de 65 años (8), el tiempo de hospitalización (10,11), la estancia previa en la unidad de cuidados intensivos (12), la gravedad de la condición de salud, la hipoalbuminemia (<2,5 g/dl) (11), el uso previo de quimioterapia, la manipulación del tubo digestivo (incluido el paso de sondas de nutrición) (13) y el uso de medicamentos que suprimen el ácido gástrico (bloqueadores de la histamina 2 o inhibidores de la bomba de protones) (12,14,15).

Correspondencia:
Carlos Carvajal, Departamento de Cuidado Crítico, Hospital Pablo Tobón Uribe, Calle 78B N° 69-240, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 545 9000, extensiones 9592 y 8502; fax: (574) 445 9594
ccarvajal@hptu.org.co

Recibido: 06/07/15; aceptado: 25/05/16

Entre las complicaciones de la infección por *C. difficile* están la alteración electrolítica, el megacolon tóxico, la perforación intestinal con peritonitis y el choque séptico, las cuales pueden llevar a la muerte (14).

Después del reconocimiento de la enfermedad y de determinar la presencia de complicaciones, el tratamiento de primera línea se basa en la administración de metronidazol o vancomicina, según la gravedad del cuadro clínico (16,17).

En el 2011, se llevó a cabo en Colombia un estudio sobre los factores de riesgo de la enfermedad, con 22 casos y 44 controles (12), en cuyo desarrollo se plantearon algunos inconvenientes en torno a la sensibilidad de la prueba diagnóstica utilizada. El Hospital Pablo Tobón Uribe cuenta desde febrero de 2010 con una prueba inmunológica de alto rendimiento para la detección de la toxina, con la cual se incrementa la exactitud del diagnóstico. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue caracterizar clínicamente los casos de enfermedad asociada a *C. difficile* en ese hospital de referencia y determinar los principales factores de riesgo asociados con su aparición.

Materiales y métodos

Lugar del estudio

El Hospital Pablo Tobón Uribe es un hospital de tercer nivel, de 365 camas, ubicado en Medellín, Colombia. Tiene dos unidades mixtas de cuidados intensivos con 37 camas y una unidad de cuidados especiales con 20 camas.

Diseño del estudio

Se hizo un estudio de casos anidado en una cohorte establecida con base en la simultaneidad del momento de inicio de la infección y el periodo transcurrido hasta su desenlace. En dicha cohorte se estableció, mediante muestreo aleatorio, un subgrupo de pacientes que cumplían con los criterios establecidos para el caso y otro de control, representativo de todos los individuos que no presentaron el desenlace. Para una adecuada estimación del efecto de los factores potencialmente asociados con el desenlace, se complementaron los casos del estudio con aquellos que no quedaron incluidos en el subgrupo inicial. Aunque parezca que los casos están excesivamente representados con respecto a la cohorte original, si el tamaño del subgrupo es, al menos, de 15 % de dicha cohorte, no se considera necesaria una ponderación en el muestreo y las medidas

de asociación estimadas no se ven afectadas por el sesgo debido a la selección completamente aleatoria de los controles (18).

Población de la cohorte

Se incluyeron pacientes con diarrea adquirida en el hospital a quienes se les había hecho la prueba para la toxina A-B de *C. difficile* entre febrero de 2010 y febrero de 2012. Solo se incluyó una prueba por paciente. Se excluyeron aquellos pacientes con muestras tomadas en consulta ambulatoria o que hubieran estado hospitalizados en otra institución.

Definición de caso

Se consideraron casos los pacientes con diarrea (al menos, tres deposiciones líquidas en un periodo de 24 horas) y resultado positivo en la prueba para la toxina (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*, ELFA) realizada en un equipo miniVIDAS® Biomeriuex.

Definición de controles

Se consideraron controles los pacientes con diarrea (al menos, tres deposiciones líquidas en un periodo de 24 horas) y prueba negativa en el subgrupo (15 %), seleccionados al azar del total de individuos a quienes se les había ordenado la prueba. Los pacientes con resultado positivo en la prueba ELFA y sin diarrea no fueron incluidos en la cohorte.

Recolección de los datos

Dos investigadores revisaron las historias clínicas de forma independiente y recolectaron las variables en un formato diseñado previamente.

Variables

Se recolectó información sobre la edad, el sexo, el centro de salud en el que se había hecho el diagnóstico, el diagnóstico de ingreso a la institución, el índice de gravedad (APACHE II) (19), la exposición a antibióticos en los 90 días previos al diagnóstico (cefalosporinas, penicilinas, carbapenemas, aminoglucósidos, quinolonas, lincosaminas o macrólidos), la exposición y el tiempo de uso de bloqueadores de la histamina 2 hasta el momento del diagnóstico, la exposición y el tiempo de uso de los inhibidores de la bomba de protones hasta el momento del diagnóstico, el tiempo de hospitalización hasta el momento del diagnóstico, la quimioterapia para cáncer en los 90 días previos al diagnóstico, la cirugía gastrointestinal y el uso de sondas para nutrición durante la hospitalización, los valores de albúmina en sangre antes del diagnóstico, las manifestaciones clínicas (dolor abdominal, distensión abdominal), la temperatura, los valores de proteína C reactiva y del leucograma, el resultado del examen coprológico, el tipo de tratamiento (vancomicina oral, metronidazol intravenoso, metronidazol oral, combinado), las complicaciones (alteración en los niveles de sodio, potasio o magnesio que requirieran corrección por parte del médico tratante, megacolon tóxico definido con base en el diagnóstico del médico tratante, perforación intestinal, falla renal aguda), el tiempo de estancia en la unidad de cuidados intensivos, el tiempo de estancia en el hospital y el estado en el momento del egreso.

Análisis de los datos

Se emplearon métodos de estadística descriptiva básica según el tipo de variable: medias con desviación estándar (DE) y medianas con rangos intercuartílicos (RIC); análisis de asociación mediante regresión logística con variables candidatas, las cuales se seleccionaron según su relevancia de acuerdo con reportes previos en la literatura científica y la frecuencia en la población de estudio: uso previo de antibióticos, de bloqueadores de histamina, de inhibidores de la bomba de protones, quimioterapia reciente, cirugía gastrointestinal o uso de sonda para nutrición durante la hospitalización.

No se hizo ninguna clase de ajuste o ponderación por la representación excesiva de los casos, se verificó el supuesto de ausencia de colinealidad mediante el factor de inflación de la varianza y no se consideraron términos de interacción en el modelo. Todos los análisis se hicieron con el programa Stata/IC 12.1 (Stata Co., College Station, TX, USA) y los resultados se presentan como riesgos relativos indirectos (*odds ratio*, OR) con su respectivo intervalo de confianza de 95 %.

Consideraciones éticas

El protocolo fue aprobado por el Comité Institucional de Investigación del Hospital Pablo Tobón Uribe.

Resultados

Durante el periodo de estudio se solicitaron 963 pruebas de toxina A-B para *C. difficile*, 147 para pacientes ambulatorios y 84 para pacientes de otras instituciones. De la cohorte restante (n=732) se seleccionó aleatoriamente un subgrupo de 110 pacientes (15 %), de los cuales 17 (15 %) fueron casos de infección confirmada con prueba positiva para la toxina. En la cohorte completa se encontraron 13 casos adicionales de infección por *C. difficile* confirmada por la prueba para la toxina, con lo cual la población final de estudio fue de 30 casos y 93 controles.

La edad media fue de 49 años (0 a 98 años) y 51 % (n=63) correspondió a pacientes de sexo masculino. El 73 % (n=90) de los pacientes había recibido antibióticos en los 90 días previos a la aparición de la diarrea, 48 % (n=59) recibió medidas de profilaxis para úlceras de estrés gástricas con ranitidina y, 49 % (n=60), con omeprazol. Veintiún pacientes (17 %) habían recibido quimioterapia en los tres meses anteriores al cuadro de diarrea, el 13 % (n=16) habían sido sometidos a cirugía gastrointestinal y en 41 % (n=50) se había empleado sonda nasogástrica antes del episodio infeccioso. El puntaje medio en el APACHE II fue de 13,5 (desviación estándar, DE=6,5), aunque en 31 pacientes (25 %) este no se pudo calcular debido a la ausencia de datos. En el cuadro 1 se muestran estas variables en los casos y los controles.

Los síntomas predominantes en la población de estudio fue el dolor abdominal (n=43, 35 %), seguido de la distensión abdominal (n=27, 22 %). La fiebre, el dolor abdominal y la distensión abdominal fueron más frecuentes en los casos de enfermedad asociada a *C. difficile* (cuadro 2). En todos los pacientes estudiados el valor medio de leucocitos fue de 10.907 células/mm^3 (DE=8,402), el de la proteína C reactiva fue de 10 mg/dl, con un rango de 0 a 42 (DE=10) y el de albúmina fue de 2,8 g/dl (SD=0,75). La mediana de estancia hospitalaria fue de 25 días (RIC=13-50), 34 pacientes (28 %) fueron atendidos en la unidad de cuidados intensivos y la mediana de estancia en dicho servicio fue de 20 días (RIC=12-26).

Los valores de estas variables en casos y controles se presentan en el cuadro 3 y, en el cuadro 4, los principales resultados del examen coprológico en la población de estudio. La presencia de moco fue más frecuente en los casos de enfermedad asociada a *C. difficile*. Aunque en el examen coprológico de pacientes con enfermedad asociada a *C. difficile* fue más frecuente la presencia de abundantes hematíes y leucocitos, dicho hallazgo no es indicativo de la enfermedad.

De los 30 casos con resultado positivo en la prueba de toxina para *C. difficile,* cinco tuvieron, además, resultados compatibles con colitis pseudomembranosa en la colonoscopia y tres en la histopatología de colon.

De los 30 casos confirmados, 12 (40 %) presentaron alguna alteración electrolítica, seis (20 %), falla renal aguda, ocho (27 %), sepsis grave, cuatro (13 %), choque séptico y cuatro pacientes (13 %) fallecieron en el hospital. Se presentó un caso de megacolon tóxico y no hubo casos de perforación intestinal. Entre los controles, la mortalidad hospitalaria fue de 11 % (n=10).

Los tratamientos administrados a los casos incluyeron metronidazol oral a 16 pacientes (53 %), vancomicina oral a cinco (17 %), vancomicina y

Cuadro 1. Caracterización de la población de estudio (casos y controles), Hospital Pablo Tobón Uribe, 2010-2012*

Variable	Casos (N=30) n (%)	Controles (N=93) n (%)
Edad en años	49,2 (27,3)	45,8 (26,7)
Puntaje APACHE II	12,7 (6,7)	13,7 (6,4)
Sexo masculino	18 (60)	45 (48,4)
Exposición a antibióticos	22 (73)	68 (73)
Exposición a ranitidina	13 (43)	46 (49)
Exposición a omeprazol	22 (73)	38 (41)
Exposición a quimioterapia	6 (20)	15 (16)
Cirugía gastrointestinal	5 (17)	11 (12)
Sonda gastrointestinal	9 (30)	41 (44)

*Las variables nominales se presentan como número absoluto (porcentaje) y, las variables continuas, como promedio (desviación estándar). La puntuación del APACHE II solo se determinó en 19 casos y 73 controles.

Cuadro 2. Principales hallazgos clínicos en casos y controles, Hospital Pablo Tobón Uribe, 2010-2012

Hallazgo clínico	Casos (N=30) n (%)	Controles (N=93) n (%)
Dolor abdominal	15 (50)	28 (30)
Distensión abdominal	11 (37)	16 (17)
Fiebre*	13 (43)	29 (31)
Leucocitosis**	14 (47)	44 (47)
Trombocitopenia***	7 (23)	22 (24)

*Fiebre: >38,3 °C; **Leucocitosis: >12.000/mm^3; ***Trombocitopenia: <150.000/mm^3

Cuadro 3. Resultados de los exámenes de laboratorio y evolución clínica de casos y controles, Hospital Pablo Tobón Uribe, 2010-2012*

Variable	Casos (N=30)	Controles (N=93)
Leucocitos (células/mm^3)	11.886 (9,453)**	10.591 (8.064)**
Proteína C reactiva (mg/dl)	12,8 (11,6)**	10,1 (9,4)**
Albúmina (g/dl)	3,06 (0,69)**	2,78 (0,76)**
Tiempo de estancia hospitalaria en días	18 (13-36)*	28 (13-51)*
Necesidad de ingreso a la unidad de cuidados intensivos	5 (17 %)	29 (31 %)
Días de estancia en la unidad de cuidados intensivos	74 (22-80)*	17 (11-26)*

Las variables se presentan como promedio (%), **: desviación estándar y *: mediana (percentil 25 % - percentil 75 %). La necesidad de ingreso en la unidad de cuidados intensivos se expresó en números absolutos y porcentaje de los casos y los controles.

metronidazol oral a cuatro (13 %), metronidazol intravenoso a tres (10 %), y vancomicina y metronidazol intravenosos a dos (7 %). En todos los pacientes (n=30) hubo remisión del cuadro clínico, definida esta como desaparición de la diarrea.

En el cuadro 5 se muestran los factores asociados con la infección por *C. difficile*.

Discusión

En este estudio la enfermedad asociada a *C. difficile* fue una causa frecuente de diarrea adquirida en el hospital (15 %) y afectó a diversos grupos de población, especialmente, adultos entre los 50 y los 70 años de edad, con un ligero predominio del sexo masculino. El uso previo de inhibidores de la bomba de protones, así como el antecedente de cirugía gastrointestinal, se asociaron con la aparición de la enfermedad.

El aporte primordial del trabajo de investigación fue la caracterización de un grupo de pacientes hospitalizados con diagnóstico de enfermedad asociada a *C. difficile* y la asociación en ellos de dos factores de riesgo (uso de inhibidores de la bomba de protones y cirugía gastrointestinal previa) y la aparición de la enfermedad. Dichos resultados pueden facilitar a los médicos algunos criterios adicionales para el diagnóstico de esta enfermedad, así como para iniciar oportunamente el tratamiento antibiótico y disminuir la aparición de algunas complicaciones.

La enfermedad asociada a *C. difficile* es la principal causa de diarrea adquirida en hospitales en el mundo entero y está asociada con altas tasas de morbilidad y mortalidad (5). Se encontró una prevalencia de la enfermedad de 15 %, muy similar a la encontrada por otros autores, la cual oscila entre 5 y 20 % (4,6,13,20).

La enfermedad asociada a *C. difficile* no ha sido claramente caracterizada a nivel local y, dadas las particularidades epidemiológicas, genéticas y microbiológicas de nuestro entorno, es válido considerar la posibilidad de un comportamiento biológico diferente al de otras latitudes.

En este orden de ideas, en una revisión bibliográfica hasta el 2009 de datos provenientes de Latinoamérica, Camacho-Ortiz, *et al*. (21), no encontraron datos procedentes de Colombia. No obstante, dos años después (2011), Becerra, *et al.,* publicaron un estudio de casos y controles centrado en los factores de riesgo asociados a la infección por *C. difficile* (12) y encontraron una asociación significativa con la edad mayor de 65 años (OR=3,4; $IC_{95\%}$ 1,1-10,1), la estancia en la unidad de cuidados intensivos (OR=4,0; $IC_{95\%}$ 1,3-12,2) y el uso de inhibidores de la bomba de protones (OR=5,15; $IC_{95\%}$ 1,6-15,9). A pesar de los datos encontrados por estos investigadores, la muestra solo incluía 22 casos y 44 controles, y se plantearon reparos sobre la sensibilidad de la prueba diagnóstica utilizada para la detección de la toxina.

Cuadro 4. Resultados del examen coprológico en pacientes sometidos a la prueba de detección de la toxina para *C. difficile,* Hospital Pablo Tobón Uribe, 2010-2012

Variables	Casos (N=30) n (%)	Controles (N=84)* n (%)
Moco en materia fecal	20 (67)	42 (50)
Hematíes		
Escasos	5 (17)	12 (14)
Cantidad moderada	1 (3)	4 (5)
Abundantes	2 (7)	1 (1)
No se observaron	22 (73)	67 (80)
Leucocitos		
0-5	2 (7)	18 (21)
>5	16 (53)	21 (25)
No se observaron	12 (40)	45 (54)

* Para nueve pacientes no se solicitó hacer examen coprológico.

Cuadro 5. Factores relacionados con la infección por *C. difficile,* Hospital Pablo Tobón Uribe, 2010-2012

Variables	Análisis univariable	Análisis multivariable
	Odds ratio ($IC_{95\%}$)	*Odds ratio* ($IC_{95\%}$)
Uso de bloqueadores de histamina	0,76 (0,33-1,72)	1,1 (0,4 - 3,81)
Uso de inhibidores de la bomba de protones	4 (1,6 -9,87)	5,84 (2 -16,8)
Exposición previa a antibióticos	1,03 (0,38-2,61)	1,22 (0,6 - 3,6)
Quimioterapia previa	1,4 (0,42-3,7)	0,91 (0,49- 3,21)
Cirugía gastrointestinal previa	1,51 (0,49-4,9)	4,5 (1,04-20,6)
Uso de sondas de nutrición entérica	0,51 (0,21-1,3)	0,36 (0,09- 0,84)

Al igual que en esta investigación, diversos estudios (3,4,16,22,23) han documentado que esta enfermedad afecta a todos los grupos poblacionales sin distinción de edad ni de sexo, aunque parece presentarse con mayor frecuencia en los adultos mayores de 65 años, en quienes, además, es más agresiva (3,12,22,24).

El diagnóstico de la enfermedad se hace con base en la presencia de síntomas como diarrea, fiebre, dolor y distensión abdominal (1,25). Si bien la

diarrea es el síntoma característico, hasta el 20 % de los pacientes puede presentar estreñimiento o deposiciones normales (17). En la institución donde se hizo la investigación, solo se solicita la prueba de detección de *C. difficile* para los pacientes que presentan diarrea, razón por la cual, el 100 % de los incluidos tenían este síntoma. El 57 % de ellos presentaron otros síntomas gastrointestinales, como distensión o dolor abdominal, la mitad tuvieron leucocitosis y solo el 34 % tuvo fiebre. En el trabajo realizado por Becerra, *et al.* (12), la fiebre y la diarrea mucosa se relacionaron claramente con la enfermedad asociada a *C. difficile,* y el dolor abdominal mostró apenas una tendencia a la asociación.

En cuanto a la estancia hospitalaria, los pacientes con enfermedad asociada a *C. difficile* estuvieron el doble de tiempo en el hospital, en comparación con los pacientes sin la enfermedad (92 *Vs*. 45 días). Pese a esto, la estancia en la sala general fue menor en los pacientes con enfermedad asociada a *C. difficile*, y fue la estancia en la unidad de cuidados intensivos (cuatro veces más prolongada en los pacientes con enfermedad asociada a *C. difficile*), la que incidió en el aumento en los días de hospitalización. Este hallazgo no se pudo explicar. Infortunadamente, debido en parte a las características del estudio, no se consiguió establecer la relación entre el tiempo previo a la hospitalización y el desarrollo de la enfermedad asociada a *C. difficile*, un dato que hubiera podido dar luces sobre otro factor asociado con la presencia de esta enfermedad.

Se encontró una mortalidad similar en ambos grupos de pacientes (11 % *Vs*. 13 %; n=4). La mortalidad estuvo por encima del 4 % encontrado en Latinoamérica (21), pero por debajo de lo encontrado por Micek, *et al*., (25 %) en Estados Unidos en una muestra de pacientes con respiración mecánica asistida (26). Kyne, *et al.*, registraron una mortalidad similar (12 %) en Irlanda (22), hallazgo que respondería a la gravedad de los pacientes en la cohorte, cuya puntuación media en el APACHE II fue de 12,7; 20 % de ellos tenía cáncer y 25% eran adultos mayores. Además, un alto porcentaje (73 %) de los pacientes había recibido antibióticos antes de la aparición de la diarrea. En una población de pacientes hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos, Marcon, *et al.* (27), encontraron una asociación entre el uso de antibióticos (principalmente ceftriaxona) y la aparición de la diarrea (OR=13; $IC_{95\%}$ 1,95-552,38). Sin embargo, al igual que en este trabajo, algunos autores (9,12) no han hallado asociación entre el uso de antibióticos y el desarrollo de enfermedad asociada con *C. difficile,* lo cual probablemente se relacione con la definición de caso (paciente con diarrea) y la marcada asociación entre el uso de antibióticos y la diarrea de diversos orígenes adquirida en el hospital. Por otro lado, este dato, opuesto a lo reportado en otros estudios, puede ser el resultado del reducido número de pacientes.

Después del análisis ajustado, se determinaron como factores de riesgo para la infección los antecedentes de uso de inhibidores de la bomba de protones y la cirugía gastrointestinal previa. El uso de sondas para la nutrición entérica se comporta como un factor protector. El uso previo de antibióticos y el uso de bloqueadores de histamina no se asociaron con la infección por *C. difficile*.

El uso de inhibidores de la bomba de protones se ha descrito como un factor de riesgo para la infección por *C. difficile* (9,12,15,28). Las posibles explicaciones se derivan de la supresión del ácido gástrico que actúa como neutralizador de la toxina y disminuye la carga de agentes patógenos que ingresan al tubo digestivo. A pesar de esto, la espora de *C. difficile* es relativamente estable frente al ácido gástrico, por lo que la explicación fisiopatológica para la asociación entre el uso de supresores de ácido y la infección por *C. difficile* no es del todo clara. Como factores que también pueden predisponer a esta infección, se han postulado la alteración de la flora intestinal, el efecto directo del germen sobre la actividad de los leucocitos (29,30), y la disminución en la expresión de genes con importantes funciones en la integridad del colonocito y en la sensibilidad a la toxina (31). En un metaanálisis en el cual se incluyeron 288.620 pacientes, Janarthanan, *et al.* (15), encontraron una asociación entre el uso de inhibidores de la bomba de protones y la infección por *C. difficile,* con un riesgo relativo de 1,65 ($IC_{95\%}$ 1,41-1,93). De la misma forma, Becerra, *et al.*, en Colombia y Leonard en un metaanálisis (12,28) encontraron la misma asociación.

El otro factor de riesgo encontrado para la enfermedad asociada con *C. difficile* fue la cirugía gastrointestinal previa. En un análisis extenso para estimar el impacto de la enfermedad en pacientes sometidos a cirugía en Estados Unidos, Zerey, *et al.* (32), encontraron que la incidencia de *C. difficile* fue 2,7 veces más alta en los pacientes que fueron operados de emergencia. Además, hallaron que la colectomía (OR=2,77; $IC_{95\%}$ 2,65-2,89), la resección de intestino delgado (OR=2,40;

$IC_{95\%}$ 2,26-2,54) y la resección gástrica (OR=2,26; $IC_{95\%}$ 2,03-2,52) representaban un mayor riesgo de adquirir la enfermedad. Los autores plantearon que, al ser el intestino un reservorio para muchos agentes patógenos que se adquieren en hospitales, su manipulación, sumada a la alteración de las defensas normales por otros factores, puede explicar la relación entre la cirugía gastrointestinal y la aparición de la enfermedad asociada con *C. difficile*. Pese a esta explicación, dicha relación no ha sido dilucidada del todo.

Contrario a lo hallado en la literatura científica (13,33), el uso de sondas de nutrición entérica se comportó como un factor protector en este estudio. Bliss, *et al.* (13), encontraron que su uso, especialmente de sondas colocadas más allá del píloro, se relacionaba con un mayor riesgo de enfermedad asociada a *C. difficile* (20 % *Vs*. 8 %). Algunas explicaciones de estos hallazgos serían el uso limitado de fórmulas elementales, las cuales se han relacionado con la infección por este germen debido a la alteración de la flora intestinal del colon (34,35), y el poco uso de sondas en el yeyuno para nutrición entérica, las cuales se han relacionado más con la infección por este microorganismo (13). Infortunadamente, no se pudieron recopilar datos sobre el tipo de sonda utilizada para la nutrición de los pacientes.

Los 30 pacientes con diagnóstico de infección por *C. difficile* recibieron tratamiento antibiótico con metronidazol o vancomicina. En una muestra de pacientes con enfermedad asociada a *C. difficile* hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos, Micek, *et al.* (26), encontraron que el 94 % de ellos había sido tratado con metronidazol, el 48 %, con vancomicina oral y, cerca del 50 %, con una combinación de vancomicina y metronidazol. En el presente estudio, independientemente del tipo de tratamiento, hubo una mejoría del cuadro clínico definida como resolución del cuadro de diarrea. Infortunadamente, no se pudo establecer la tasa de recaídas de la enfermedad. La recomendación general, dada la similar reacción clínica a los dos tratamientos (36,37), es tratar las formas leves a moderadas de la enfermedad con metronidazol y dejar la vancomicina para las formas graves, pues ha habido un incremento en la proporción de pacientes que no mejoran con metronidazol y que tienen mayor porcentaje de recaídas (16,17). Vale la pena anotar que en Colombia, al igual que en gran parte de América Latina, la presentación más accesible de la vancomicina es la solución inyectable (21). En el presente estudio, los pacientes recibieron la solución inyectable de vancomicina por vía oral, con éxito en todos ellos y sin que se registraran reacciones adversas.

El estudio tuvo varias limitaciones que deben tenerse en cuenta. Primero, su ubicación en un solo centro de atención que, además, es un hospital universitario, no permite la generalización de los resultados. Segundo, a pesar de contar con una prueba inmunológica de alto rendimiento para la detección de la toxina, de sensibilidad cercana al 80 % (38), el método utilizado no es el más sensible, lo cual no permite descartar con certeza que algunos de los controles correspondieran realmente a casos. Pese a ello, los métodos diagnósticos empleados en el mundo (9) y en Latinoamérica (21) están restringidos, en general, a la detección de toxinas y son principalmente ensayos enzimáticos (toxinas A o AB); en pocas ocasiones se recurre a métodos de cultivo celular para determinar los cambios citopáticos (39,40) o a pruebas de reacción en cadena de la polimerasa. Tercero, el tamaño de la muestra no tuvo poder suficiente para detectar factores de riesgo con una menor magnitud de asociación con el resultado o con una aparición infrecuente en la población de estudio. Por último, es necesario tener en cuenta que la selección de los controles se hizo entre pacientes con diarrea de origen hospitalario y sospecha de infección por *C. difficile,* pero con resultado negativo en la prueba para la toxina. Estos controles podrían no representar realmente a toda la población en riesgo de adquirir la infección.

En conclusión, la infección por *C. difficile* está presente en una proporción significativa de pacientes adultos con cuadros de diarrea adquirida en el hospital. El uso de inhibidores de la bomba de protones y la cirugía gastrointestinal previa se relacionaron con la enfermedad asociada a *C. difficile*, en tanto que el uso de sondas para la nutrición entérica se comportó como un factor protector.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no haber tenido ningún conflicto de intereses.

Financiación

Para el desarrollo de esta investigación no se contó con ninguna fuente de financiación.

Referencias

1. **Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB.** Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N Engl J Med. 1978;298:531-4. http://dx.doi.org/10.1056/NEJM197803092981003

2. **Bartlett JG.** Antibiotic-associated diarrhea. N Engl J Med. 2002;346:334-9. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMcp011603

3. **Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, *et al*.** A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. N Engl J Med. 2005;353:2442-9. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa051639

4. **Miller MA, Hyland M, Ofner-Agostini M, Gourdeau M, Ishak M.** Morbidity, mortality, and healthcare burden of nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Canadian hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol. 2002;23: 137-40. http://dx.doi.org/10.1086/502023

5. **O'Brien JA, Lahue BJ, Caro JJ, Davidson DM.** The emerging infectious challenge of *Clostridium difficile*-associated disease in Massachusetts hospitals: Clinical and economic consequences. Infect Control Hosp Epidemiol. 2007;28: 1219-27. http://dx.doi.org/10.1017/S0195941700026072

6. **Kyne L, Hamel MB, Polavaram R, Kelly CP.** Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. Clin Infect Dis. 2002;34:346-53. http://dx.doi.org/10.1086/338260

7. **Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, *et al*.** Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. Am J Gastroenterol. 2013;108:478-98. http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2013.4

8. **Olson MM, Shanholtzer CJ, Lee JT Jr.** Gerding DN. Ten years of prospective *Clostridium difficile*-associated disease surveillance and treatment at the Minneapolis VA Medical Center, 1982-1991. Infect Control Hosp Epidemiol. 1994;15:371-81.

9. **Kwok CS, Arthur AK, Anibueze CI, Singh S, Cavallazzi R, Loke YK.** Risk of *Clostridium difficile* infection with acid suppressing drugs and antibiotics: Meta-analysis. Am J Gastroenterol. 2012;107:1011-9. http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2012.108

10. **McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE.** Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med.1989;320:204-10. http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198901263200402

11. **Al-Tureihi FI, Hassoun A, Wolf-Klein G, Isenberg H.** Albumin, length of stay, and proton pump inhibitors: Key factors in *Clostridium difficile*-associated disease in nursing home patients. J Am Med Dir Assoc. 2005;6:105-8. http://dx.doi.org/10.1016/j.jamda.2005.01.003

12. **Becerra MG, Ospina S, Atehortúa SL, Berbesi DY.** Factores de riesgo para la infección por *Clostridium difficile*. Infectio. 2011;15:220-6.

13. **Bliss DZ, Johnson S, Savik K, Clabots CR, Willard K, Gerding DN.** Acquisition of *Clostridium difficile* and *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients receiving tube feeding. Ann Intern Med. 1998; 129:1012-9. http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-129-12-199812150-00004

14. **Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, *et al*.** Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). Infect Control Hosp Epidemiol. 2010;31:431-55. http://dx.doi.org/10.1086/651706

15. **Janarthanan S, Ditah I, Adler DG, Ehrinpreis MN.** *Clostridium difficile*-associated diarrhea and proton pump inhibitor therapy: A meta-analysis. Am J Gastroenterol. 2012;107:1001-10. http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2012.179

16. **Pepin J, Alary ME, Valiquette L, Raiche E, Ruel J, Fulop K, *et al*.** Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. Clin Infect Dis. 2005;40:1591-7. http://dx.doi.org/10.1086/430315

17. **Musher DM, Aslam S, Logan N, Nallacheru S, Bhaila I, Borchert F, *et al*.** Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole. Clin Infect Dis. 2005;40:1586-90. http://dx.doi.org/10.1086/430311

18. **Kulathinal S, Karvanen J, Saarela O, Kuulasmaa K.** Case-cohort design in practice - experiences from the MORGAM Project. Epidemiol Perspect Innov. 2007;4:15. http://dx.doi.org/10.1186/1742-5573-4-15

19. **Knaus WA, Wagner DP, Draper EA, Zimmerman JE, Bergner M, Bastos PG, *et al*.** The APACHE III prognostic system. Risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalized adults. Chest. 1991;100:1619-36.

20. **Álvarez-Lerma F, Palomar M, Villasboa A, Amador J, Almirall J, Posada MP, *et al*.** Epidemiological study of *Clostridium difficile* infection in critical patients admitted to the Intensive Care Unit. Med Intensiva. 2014;38:558-66. http://dx.doi.org/10.1016/j.medin.2013.11.007

21. **Camacho-Ortiz A, Ponce-de-León A, Sifuentes-Osornio J.** Enfermedad asociada a *Clostridium difficile* en América Latina. Gac Méd Méx. 2009;145:223-9.

22. **Kyne L, Merry C, O'Connell B, Kelly A, Keane C, O'Neill D.** Factors associated with prolonged symptoms and severe disease due to *Clostridium difficile*. Age Ageing. 1999;28:107-13. http://dx.doi.org/10.1093/ageing/28.2.107

23. **Turco R, Martinelli M, Miele E, Roscetto E, Del Pezzo M, Greco L, *et al*.** Proton pump inhibitors as a risk factor for paediatric *Clostridium difficile* infection. Aliment Pharmacol Ther. 2010;31:754-9. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2036.2009.04229.x

24. **Karlstrom O, Fryklund B, Tullus K, Burman LG.** A prospective nationwide study of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Sweden. The Swedish *C. difficile* Study Group. Clin Infect Dis. 1998;26:141-5. http://dx.doi.org/10.1086/516277

25. **Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT.** *Clostridium difficile* colitis. N Engl J Med. 1994;330:257-62. http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199401273300406

26. **Micek ST, Schramm G, Morrow L, Frazee E, Personett H, Doherty JA, *et al*.** *Clostridium difficile* infection: A multicenter study of epidemiology and outcomes in mechanically ventilated patients. Crit Care Med. 2013;41:1968-75. http://dx.doi.org/10.1097/CCM.0b013e31828a40d5.

27. **Marcon AP, Gamba MA, Vianna LA.** Nosocomial diarrhea in the intensive care unit. Braz J Infect Dis. 2006;10:384-9. http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702006000600005

28. **Leonard J, Marshall JK, Moayyedi P.** Systematic review of the risk of enteric infection in patients taking acid suppression. Am J Gastroenterol. 2007;102:2047-56. http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01275.x

29. **Zedtwitz-Liebenstein K, Wenisch C, Patruta S, Parschalk B, Daxbock F, Graninger W.** Omeprazole treatment diminishes intra- and extracellular neutrophil reactive oxygen production and bactericidal activity. Crit Care Med. 2002;30:1118-22.

30. **Agastya G, West BC, Callahan JM.** Omeprazole inhibits phagocytosis and acidification of phagolysosomes of normal human neutrophils *in vitro*. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2000;22:357-72. http://dx.doi.org/10.3109/08923970009016425

31. **Hegarty JP, Sangster W, Harris LR 3rd, Stewart DB.** Proton pump inhibitors induce changes in colonocyte gene expression that may affect *Clostridium difficile* infection. Surgery. 2014;156:972-8. http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2014.06.074

32. **Zerey M, Paton BL, Lincourt AE, Gersin KS, Kercher KW, Heniford BT.** The burden of *Clostridium difficile* in surgical patients in the United States. Surg Infect (Larchmt). 2007;8:557-66. http://dx.doi.org/10.1089/sur.2006.062

33. **Wijarnpreecha K, Sornprom S, Thongprayoon C, Phatharacharukul P, Cheungpasitporn W, Nakkala K.** The risk of *Clostridium difficile* associated diarrhea in nasogastric tube insertion: A systematic review and meta-analysis. Dig Liver Dis.2016;48:468-72. http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2016.01.012

34. **Iizuka M, Itou H, Konno S, Chihara J, Tobita M, Oyamada H, *et al*.** Elemental diet modulates the growth of *Clostridium difficile* in the gut flora. Aliment Pharmacol Ther. 2004;20(Suppl.1):151-7.

35. **May T, Mackie RI, Fahey GC Jr, Cremin JC, Garleb KA.** Effect of fiber source on short-chain fatty acid production and on the growth and toxin production by *Clostridium difficile*. Scand J Gastroenterol. 1994;29:916-22.

36. **Teasley DG, Gerding DN, Olson MM, Peterson LR, Gebhard RL, Schwartz MJ, *et al*.** Prospective randomised trial of metronidazole versus vancomycin for *Clostridium difficile*-associated diarrhoea and colitis. Lancet. 1983;2:1043-6. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(83)91036-X

37. **Silva J Jr, Batts DH, Fekety R, Plouffe JF, Rifkin GD, Baird I.** Treatment of *Clostridium difficile* colitis and diarrhea with vancomycin. Am J Med. 1981;71:815-22.

38. **Turgeon DK, Novicki TJ, Quick J, Carlson L, Miller P, Ulness B, *et al*.** Six rapid tests for direct detection of *Clostridium difficile* and its toxins in fecal samples compared with the fibroblast cytotoxicity assay. J Clin Microbiol. 2003;41:667-70. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.2.667-670.2003

39. **Álvarez M, González R, Briceño I, Cofre C, Labarca J, Vial P, *et al*.** Diagnosis of *Clostridium difficile* diarrhea: In search of a more efficient clinical focus. Rev Med Chil. 2001;129:620-5.

40. **Fernández-Canigia L, Nazar J, Arce M, Dadamio J, Smayevsky J, Bianchini H.** *Clostridium difficile* diarrhea: Frequency of detection in a medical center in Buenos Aires, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2001;33:101-7.

Biomédica 2017;37:62-7
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3280

ARTÍCULO ORIGINAL

Características sociodemográficas y clínicas de pacientes con infección por *Leptospira* spp. atendidos en cuatro centros hospitalarios de Medellín, Colombia, 2008-2013

Lina María Echeverri-Toro[1,2], Sara Penagos[3], Laura Castañeda[2], Pablo Villa[3,4,5], Santiago Atehortúa[1,2], Faiver Ramírez[2,6], Carlos Restrepo[3,4,5], Sigifredo Ospina[1,2], Yuli Agudelo[1], Alicia Hidrón[3,6,7], Paola Agudelo[8], Eliana Valderrama[8], Carlos Andrés Agudelo[2,3,4]

[1] Servicio de Microbiología Médica, Hospital Universitario de San Vicente Fundación, Medellín, Colombia
[2] Servicio de Microbiología Médica y Enfermedades Infecciosas, Centros Especializados de San Vicente Fundación, Medellín, Colombia
[3] Servicio de Medicina Interna, Escuela de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia
[4] Servicio de Enfermedades Infecciosas, Clínica Universitaria Bolivariana, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia
[5] Servicio de Enfermedades Infecciosas, IPS Universitaria León XIII, Medellín, Colombia
[6] Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia
[7] Division of Infectious Diseases, School of Medicine, Emory University, Atlanta, USA
[8] Departamento de Microbiología y Bioanálisis, Colegio Mayor de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. La leptospirosis continúa siendo un problema significativo de salud en regiones tropicales, incluidos los países de Latinoamérica, donde es 100 veces más frecuente que en otras regiones del mundo. En los cuadros graves de la enfermedad, su mortalidad alcanza el 10 %. Su diagnóstico es un reto debido a que las manifestaciones clínicas en la fase inicial son inespecíficas y a la poca disponibilidad de pruebas diagnósticas.
Objetivo. Describir las características sociodemográficas y clínicas, y el desenlace de la enfermedad en pacientes hospitalizados con leptospirosis.
Materiales y métodos. Es un estudio retrospectivo que incluyó pacientes atendidos en cuatro instituciones de Medellín, entre enero de 2009 y diciembre de 2013, con un cuadro clínico sugestivo e IgM positiva para *Leptospira* spp.
Resultados. Se incluyeron 119 pacientes, 80 % hombres y 58 % de procedencia rural. La duración promedio de los síntomas fue de 9,6 días (DE=9,6). El 89 % de los pacientes presentó fiebre; el 62 %, ictericia; el 74 %, mialgias; el 46 %, diarrea; el 41 %, hepatomegalia; el 13 %, esplenomegalia, y 13 %, enrojecimiento de los ojos. En 54 % de los pacientes hubo deterioro de la función renal, en 32 %, compromiso pulmonar y, en 13 %, falla hepática. El 16 % de los pacientes requirió atención en la unidad de cuidados intensivos, el 12 %, asistencia respiratoria mecánica, y el 11 %, administración de vasopresores. En 38,6 % de ellos la enfermedad cursó con síndrome de Weil y el 5 % falleció. La duración promedio de la hospitalización fue de 11 días (DE=9,6).
Conclusiones. La leptospirosis en esta población tuvo manifestaciones clínicas y complicaciones similares a las reportadas en la literatura científica. Se observó una mortalidad general relativamente baja comparada con las estadísticas mundiales.

Palabras clave: *Leptospira;* leptospirosis; signos y síntomas; mortalidad; zoonosis; diagnóstico; Colombia.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3280

Sociodemographic and clinical characteristics of patients infected with *Leptospira* spp. treated at four hospitals in Medellín, Colombia, 2008-2013

Introduction: Leptospirosis remains a significant health problem in tropical regions including Latin America, where its presentation is 100 times higher than that observed in other regions of the world. Mortality reaches 10% in severe cases. Its diagnosis is challenging because clinical manifestations during the initial phase are non-specific and because of limited availability of diagnostic tests.

Contribución de los autores:
Lina María Echeverri-Toro, Sigifredo Ospina, Yuli Agudelo, Paola Agudelo y Eliana Valderrama: concepción y escritura del proyecto de investigación en su fase inicial
Laura Castañeda y Sara Penagos: consolidación de la información en bases de datos
Todos los autores participaron en la revisión de las historias clínicas en cada una de las instituciones participantes, en la recolección de la información necesaria para completar los formularios, en el análisis de los resultados y en la escritura del artículo final.

Objective: To describe the demographic and clinical characteristics and the outcomes in hospitalized patients with leptospirosis.
Materials and methods: This retrospective study included patients treated at four institutions in Medellín between January, 2009, and December, 2013, with a compatible clinical picture and a positive IgM for *Leptospira* spp.
Results: We included 119 patients, 80% male, and 58% of rural origin. The mean duration of symptoms was 9.6 days (SD=9.6). Eighty nine per cent of patients had fever; 62%, jaundice; 74%, myalgia; 46%, diarrhea; 41%, hepatomegaly; 13%, splenomegaly, and 13%, conjunctival injection. Fifty four per cent of patients had impaired renal function; 32%, pulmonary compromise, and 13%, liver failure. Sixteen per cent required admission to the ICU; 12%, mechanical ventilation, and 11%, vasopressor therapy. Weil's syndrome occurred in 38.6% and 5% died. The average hospital stay was 11 days (SD=9.6).
Conclusions: In this population, the clinical manifestations and complications of leptospirosis were similar to those reported in the literature. We observed a relatively low overall mortality in relation to global statistics.

Key words: *Leptospira*; leptospirosis; signs and symptoms; mortality; zoonoses; diagnosis; Colombia.
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3280

La leptospirosis es una zoonosis causada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira* y se considera una enfermedad reemergente de distribución mundial. La infección en humanos ocurre por contacto directo o indirecto con orina o tejidos contaminados de animales infectados, como roedores, animales de granja y mamíferos pequeños, o por contacto con agua o suelo contaminados con la orina de estos animales (1-4).

Alrededor del mundo se reportan más de 500.000 casos de leptospirosis grave cada año, con una incidencia de 0,1 a 1 por cada 100.000 habitantes en climas templados y de 10 a 100 por cada 100.000 habitantes en climas tropicales (5,6). En Colombia, la incidencia reportada en el 2014 fue de 1,7 por 100.000 habitantes y la seroprevalencia en zonas de alto riesgo es de 12,5 a 47 % según diferentes estudios (7-15).

La enfermedad se presenta en forma leve en 90 a 95 % de los casos y, de forma grave, en 5 a 10 % (7). Las manifestaciones clínicas incluyen fiebre, cefalea, mialgias, enrojecimiento de los ojos, náuseas, vómito e ictericia. Las principales complicaciones son el daño renal agudo, el compromiso pulmonar y la falla hepática. La mortalidad en los casos graves es del 10 % y, si se presenta con síndrome de Weil, fluctúa entre 5 y 40 %, en tanto que con hemorragia alveolar es mayor de 50 % (1,16).

Correspondencia:
Lina María Echeverri-Toro, Servicio de Microbiología Médica, Hospital Universitario de San Vicente Fundación, Calle 64 N° 51D-154, bloque 16, tercer piso, Medellín, Colombia
Teléfonos: (574) 444 1333, extensión 3107; (574) 516 7432
linamariae@hotmail.com

Recibido: 14/03/16; aceptado: 31/05/16

Aunque se trata de una enfermedad claramente reconocida, se considera que hay subregistro, debido a que las manifestaciones clínicas en la fase inicial son inespecíficas y similares a las de otras enfermedades tropicales febriles, a la poca disponibilidad de pruebas diagnósticas y a que no suscita la sospecha clínica en el personal médico (2-4,7,17-19).

El propósito de este estudio fue describir las características sociodemográficas y clínicas, y el desenlace de la enfermedad en pacientes hospitalizados con leptospirosis, con el fin de mejorar el índice de sospecha clínica entre los médicos, promover un diagnóstico temprano y, en lo posible, incidir en el desenlace de la enfermedad en los pacientes.

Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio descriptivo retrospectivo en cuatro hospitales de alta complejidad de Medellín, Colombia. Se incluyeron pacientes de todas las edades con diagnóstico clínico de leptospirosis y prueba de inmunoglobulina M (IgM) positiva contra *Leptospira* spp. (IgM ELISA-PanBio®, BioMérieux), atendidos en las instituciones incluidas en el estudio, entre enero de 2008 y diciembre de 2013. Se excluyeron los pacientes con información insuficiente sobre las variables evaluadas.

Se registraron las variables sociodemográficas, las manifestaciones clínicas, los resultados de laboratorio, el tratamiento antibiótico, la estancia hospitalaria y las muertes. Se definió el daño renal agudo en cualquier momento de la evolución, según los criterios de la *Acute Kidney Injury Network* (20). El compromiso pulmonar se definió como la presencia de alteración pulmonar en cualquier momento de la evolución según los registros de la historia clínica y se clasificó como derrame pleural, infiltrados

intersticiales, infiltrados alveolares, síndrome de dificultad respiratoria aguda y hemorragia alveolar. En ausencia de otra explicación, dicho síndrome se definió por la presencia de hipoxemia e infiltrados alveolares en los cuatro cuadrantes. La falla hepática se definió como la elevación de los niveles de transaminasas (INR>1,5) y encefalopatía en cualquier momento de la evolución en ausencia de enfermedad hepática crónica. El síndrome de Weil se definió como la presencia de daño renal agudo y elevación de los niveles de bilirrubinas (21).

Los datos se analizaron con herramientas de estadística descriptiva, como la media con desviación estándar (DE), y valores mínimos y máximos para las variables cuantitativas. En el caso de las variables cualitativas, se utilizaron las frecuencias absolutas y relativas. Se empleó el programa SPSS 17.0®. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad Pontificia Bolivariana y por los comités de investigación de las instituciones de salud participantes.

Resultados

Se incluyeron 119 pacientes en el estudio. La edad promedio fue de 35,4 años (DE=18,5, rango de 5 a 81 años); 95 pacientes (79,8 %) eran hombres, 65 (58 %) provenían del área rural y 43 (34 %) procedían de Medellín. En 5,6 % de los casos no se registró la procedencia. Las ocupaciones más comunes fueron las de estudiante, agricultor, operario y ama de casa (cuadro 1).

En los exámenes de laboratorio, las alteraciones más frecuentes fueron la trombocitopenia en 57 pacientes (47 %), la elevación de al menos una transaminasa (ALT>41 IU/L o AST>38 IU/L) en 96 pacientes (82,1 %), la elevación de la bilirrubina total (>1,3 mg/dl) en 77 pacientes (67,5 %) y la elevación de la creatinina (por encima de 1,2 mg/dl) en 61 pacientes (52,6 %). El valor promedio de la aspartato aminotransferasa (AST) fue de 207 IU/L (DE=730), el de la alanina transaminasa (ALT), de 162 IU/L (DE=354), el de la bilirrubina total, de 7,2 mg/dl (DE=11,3), y el de la creatinina, de 2,4 mg/dl (DE=2,6). Las alteraciones en el análisis citoquímico de orina fueron la proteinuria (48,7 %), la hematuria (42,9 %) y la piuria (41,2 %). Las principales complicaciones y resultados observados en los pacientes con leptospirosis se presentan en el cuadro 2.

Ciento ocho pacientes (90,8 %) recibieron tratamiento antibiótico durante 9,5 días (DE=4,1), en promedio. Los antibióticos utilizados con mayor frecuencia fueron ceftriaxona (29,4 %), penicilina cristalina (10,1 %), doxiciclina (10,1 %), la combinación de piperacilina y tazobactam (8,4 %), la de ampicilina y sulbactam (7,6 %) y la de ceftriaxona y doxiciclina (7,6 %). No se reportó la reacción de Jarisch-Herxheimer como efecto secundario en ninguno de los pacientes.

Diecinueve pacientes (16 %) requirieron manejo en la unidad de cuidados intensivos; 14 (11,8 %) requirieron asistencia respiratoria mecánica y 13 (10,9 %) requirieron tratamiento con vasopresores. El tiempo promedio de estancia en la unidad de cuidados intensivos fue de 11,1 días (DE=10) y la duración de la hospitalización fue de 20,7 días (DE=17,3).

Durante la hospitalización fallecieron seis pacientes (5 %), 66 % de los cuales procedía del área rural. La duración promedio de los síntomas en este

Cuadro 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes con leptospirosis atendidos en hospitales de Medellín, Colombia

Característica	Población total (n=119)	Población sobreviviente con tratamiento antibiótico (n=101)	Población sobreviviente sin tratamiento antibiótico (n=12)	Muertos (n=6)
Edad, media (DE)	35,4 (18,5)	35,6 (18,5)	36,6 (12,9)	27,8 (23,3)
Procedencia rural, n (%)	65 (58)	43 (42,5)	2 (16)	4 (66,6)
Sexo masculino, n (%)	95 (79,8)	89 (88,1)	8 (66,6)	1 (16,6)
Días de síntomas, media (DE)	9,6 (9,6)	9,3 (9,4)	11,8 (11,9)	7,5 (3,4)
Fiebre, n (%)	106 (89,1)	88 (87,1)	12 (100)	6 (100)
Mialgias, n (%)	88 (73,9)	73 (72,2)	10 (83,3)	5 (83,3)
Dolor abdominal, n (%)	79 (66,4)	69 (68,3)	6 (50)	4 (66,6)
Vómito, n (%)	77 (64,7)	64 (63,3)	7 (58,3)	6 (100)
Ictericia, n (%)	74 (62,2)	64 (63,3)	4 (33)	6 (100)
Artralgias, n (%)	73 (61,3)	62 (61,3)	8 (66,6)	3 (50)
Cefalea, n (%)	63 (52,9)	51 (50,4)	8 (66,6)	4 (66,6)
Hepatomegalia, n (%)	49 (41,2)	43 (42,5)	3 (25)	3 (50)
Esplenomegalia, n (%)	15 (12,6)	12 (11,8)	1 (8,3)	2 (33,3)
Enrojecimiento de los ojos, n (%)	15 (12,6)	14 (13,8)	1 (8,3)	0 (0)

Cuadro 2. Complicaciones y desenlaces en pacientes con leptospirosis atendidos en hospitales de Medellín, Colombia

Complicaciones y desenlaces	Población total (n=119)	Población con tratamiento antibiótico sobreviviente (n=101)	Población sin tratamiento antibiótico sobreviviente (n=2)	Muertos (n=6)
Daño renal agudo, n (%)	64 (53,8)	56 (55,4)	3 (25)	5 (83,3)
Diálisis, n (%)	14 (11,8)	10 (9,9)	0 (0)	4 (66,6)
Síndrome de Weil, n (%)	46 (38,6)	39 (38,6)	2 (16)	5 (83,3)
Compromiso pulmonar, n (%)	38 (31,9)	34 (33,6)	1 (8,3)	3 (50)
Derrame pleural, n (%)	14 (11,8)	13 (12,8)	0 (0)	1 (16,6)
Infiltrados intersticiales, n (%)	9 (7,6)	8 (7,9)	1 (8,3)	0 (0)
SDRA, n (%)	6 (5)	5 (4,9)	0 (0)	1 (16,6)
Infiltrados alveolares, n (%)	5 (4,2)	5 (4,9)	0 (0)	0 (0)
Hemorragia alveolar, n (%)	4 (3,4)	3 (2,9)	0 (0)	1 (16,6)
Falla hepática, n (%)	16 (13,4)	11 (10,8)	0 (0)	5 (83,3)
Estancia en unidad de cuidados intensivos, n (%)	19 (16)	13 (12,8)	0 (0)	6 (100)
Muerte, n (%)	6 (5)	0 (0)	0 (0)	6 (100)

SDRA: síndrome de dificultad respiratoria aguda

grupo de pacientes fue de 7,5 días (DE=3,5) y todos presentaron fiebre, ictericia y vómito. En el examen físico, tres de estos pacientes (50 %) presentaron hepatomegalia, dos de ellos (33 %), esplenomegalia y ninguno presentó enrojecimiento de los ojos. Las principales complicaciones asociadas a la infección en los pacientes que fallecieron fueron el daño renal agudo en cinco de ellos (83 %), tratado con diálisis en cuatro (66 %), en tanto que la falla hepática se presentó en cinco pacientes (83 %), el síndrome de Weil también en cinco (83 %) y el compromiso pulmonar en 50 % de ellos (un paciente con hemorragia alveolar, uno con síndrome de dificultad respiratoria aguda y uno con derrame pleural). Todos los pacientes fallecidos recibieron tratamiento antibiótico: dos con cefotaxime, otro con meropenem, otro con la combinación de piperacilina y tazobactam más doxiciclina, otro con piperacilina y tazobactam, y otro con un antibiótico sin actividad contra *Leptospira* spp*.,* cuya administración se inició, en promedio, a los 14,5 días (DE=10,8) del inicio de los síntomas y se mantuvo durante 8,5 días (DE=4,7), en promedio. Todos estos pacientes ingresaron a la unidad de cuidados intensivos, y requirieron manejo con vasopresores y asistencia respiratoria mecánica. Cinco fallecieron por falla orgánica múltiple y uno por falla hepática fulminante.

Discusión

Este estudio incluyó 119 pacientes hospitalizados con diagnóstico de leptospirosis, en quienes se encontró una mayor frecuencia de complicaciones, especialmente falla hepática y síndrome de Weil, y una mortalidad general similar a la reportada en Colombia, pero inferior a la informada en algunas series de casos en otros países (22-29). Se encontró, además, que cerca del 10 % de los pacientes no recibió tratamiento antibiótico a pesar de encontrarse hospitalizado.

La gravedad de la enfermedad se ha relacionado con la infección por la serovariedad *icterohaemorrhagiae*, la cual se ha asociado con mayor frecuencia al compromiso hepático y renal (5,23,25,30), principales complicaciones observadas en la población de estudio. Sin embargo, esta no ha sido la serovariedad más frecuente en el departamento de Antioquia. En el Urabá antioqueño se ha reportado el predominio de la serovariedad *grippotyphosa*, mientras que en el centro del departamento se ha registrado el predominio del serotipo *pomona* (9,12).

La gran frecuencia de complicaciones, especialmente de la falla hepática, también puede explicarse por el tipo de población incluida, es decir, pacientes hospitalizados en centros de referencia, la mayoría de ellos en hepatología.

Aunque la frecuencia de complicaciones fue superior a la descrita en la mayoría de las series, la mortalidad no excedió la informada en otros estudios colombianos y en el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (1,5 a 5 %) (6,15,18,22,24,31), y fue inferior a la reportada en las series de casos en otros países (7 a 22 %) (23-29,32,33). Esta disociación entre una mayor frecuencia de complicaciones y una menor mortalidad es difícil de explicar, especialmente si se tiene en cuenta el gran número de pacientes que presentó síndrome de Weil, complicación asociada con una mayor mortalidad (32-34). En este estudio, el intervalo entre el inicio de los síntomas, el diagnóstico de la enfermedad y el inicio temprano del tratamiento

antibiótico fue corto, lo cual se ha asociado con una menor mortalidad (26,35). Sin embargo, otros factores relacionados con las serovariedades infecciosas, las condiciones de base de los pacientes, la respuesta inmunitaria del huésped o la calidad de la atención prestada, no pueden descartarse como explicación para la disociación entre la mayor frecuencia de complicaciones y una menor mortalidad.

Existe controversia con respecto al tratamiento antibiótico, pues la mayoría de los casos de leptospirosis aguda se resuelven espontáneamente. Algunos estudios sugieren que, en pacientes con enfermedad grave, la administración temprana de antibióticos se asocia con una reducción en la duración de la enfermedad y en las tasas de mortalidad (36-38). Por el contrario, en una revisión sistemática de la literatura científica no se demostraron los beneficios del tratamiento antibiótico en la reducción de la mortalidad (39). El 10 % de los pacientes de la serie de casos del presente estudio no recibió tratamiento antibiótico, y en dicho grupo no hubo un desenlace fatal. Sin embargo, este es un estudio descriptivo y, por lo tanto, puede haber sesgos en cuanto a las razones por las cuales este grupo de pacientes no recibió antibióticos, por ejemplo, una menor gravedad de la enfermedad.

Este estudio tiene varias limitaciones, pues su diseño retrospectivo favorece los sesgos de información y selección (solo se incluyeron pacientes hospitalizados). Además, el diagnóstico no fue confirmado con una prueba diferente a la de detección de IgM para *Leptospira interrogans.* La carencia de pruebas de aglutinación microscópica impidió contar con la identificación de las serovariedades, información necesaria para explicar el comportamiento clínico de la enfermedad.

La leptospirosis en esta población de pacientes hospitalizados tuvo manifestaciones clínicas y complicaciones similares a las reportadas en la literatura científica, con diferencias en el tipo de compromiso pulmonar. Sin embargo, se requiere más información para aclarar si este comportamiento obedece a variaciones geográficas en las serovariedades de *L. interrogans*, la virulencia del germen, la hospitalización de pacientes con formas menos graves de la enfermedad o las diferencias en la oportunidad y la calidad del tratamiento.

En conclusión, la leptospirosis puede confundirse fácilmente con otras enfermedades infecciosas febriles debido a lo inespecífico y diverso de sus manifestaciones, por eso, es importante mejorar el índice de sospecha clínica de esta enfermedad en la práctica médica, con el fin de diagnosticarla tempranamente e incidir favorablemente en su desenlace.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existe ningún conflicto de intereses.

Financiación

No se requirió ningún tipo de financiación.

Referencias

1. **McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, KO AI.** Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis. 2005;18:376-86.
2. **Moreno N, Agudelo-Flórez P.** Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2010;27:548-56.
3. **World Health Organization, International Leptospirosis Society.** Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: WHO, ILS; 2003.
4. **Instituto Nacional de Salud.** Protocolo de vigilancia en salud pública. Leptospirosis. Fecha de consulta: 25 de julio del 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Leptospirosis.pdf
5. **Tubiana S, Mikulski M, Becam J, Lacassin F, Lefèvre P, Gourinat AC, *et al.*** Risk factors and predictors of severe leptospirosis in New Caledonia. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:e1991. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001991
6. **Bello S, Rodríguez M, Paredes A, Mendivelso F, Walteros D, Rodríguez F.** Comportamiento de la vigilancia epidemiológica de la leptospirosis humana en Colombia, 2007-2011. Biomédica. 2013;33(Supl.1):153-60. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.1608
7. **Echeverri LM, Atehortúa SL, Ospina S.** Leptospirosis con inmunoglobulina M positiva de pacientes hospitalizados en una institución de tercer nivel de Medellín, Colombia, en 2009. Infectio. 2011;15:118-23.
8. **Agudelo-Flórez P.** Leptospirosis humana en Colombia: la experiencia del Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES. CES Medicina. 2007;21(Supl. 1):55-8.
9. **Agudelo P, Restrepo BN, Arboleda M.** Situación de la leptospirosis en el Urabá antioqueño colombiano: estudio seroepidemiológico y factores de riesgo en población general urbana. Cad Saúde Pública. 2007;23:2094-102. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2007000900017
10. **Ferro BE, Rodríguez AL, Pérez M, Travi BL.** Seroprevalencia de infección por *Leptospira* en habitantes de barrios periféricos de Cali. Biomédica. 2006;26:250-7. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v26i2.1414
11. **Góngora A, Parra J, Aponte L.** Seroprevalencia de *Leptospira* spp. en grupos de población de Villavicencio, Colombia. Rev Salud Pública. 2008;10:269-78. http://dx.doi.org/10.1590/S0124-00642008000200007

12. **Ochoa JE, Sánchez A, Ruiz I.** Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. Rev Panam Salud Pública. 2000;7:325-31. http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892000000500006

13. **Orrego A, Giraldo-de-León G, Ríos B, Valencia PA.** Leptospirosis en personas de riesgo de quince explotaciones porcinas y de la central de sacrificio de Manizales, Colombia. Arch Med Vet. 2003;3:1-10.

14. **Nájera S, Alvis N, Babilonia D, Álvarez L, Máttar S.** Occupational leptospirosis in a Colombian Caribbean area. Salud Pública Méx. 2005;47:240-4. http://dx.doi.org/10.1590/S0036-36342005000300008

15. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 50 de 2014 (7 de diciembre al 13 de diciembre). Fecha de consulta: julio 26 del 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2014%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2050.pdf

16. **Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Díaz MM, Lovett MA, *et al*.** Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis. 2003;3:757-71. http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2

17. **Saad C, Morón L, Parra E, Higuera L, Pachecho A.** Leptospirosis humana: hallazgos clínicos e histopatológicos en un caso y revisión de la literatura. Rev Col de Enfermería. 2006;1:51-63.

18. **Astudillo M, González A, Batista N, Mirabal M, Menéndez J.** Estudio seroepidemiológico de la leptospirosis humana en el departamento del Valle del Cauca, Colombia. Rev Cubana Med Trop. 2009;61.

19. **Macías JC, Vergara C, Romero C, Falconar A.** Comportamiento de la leptospirosis en el departamento del Atlántico (Colombia). Enero de 1999 a marzo del 2004. Salud Uninorte. 2005;20:18-29.

20. **Kidney Disease: Improving Global Outcomes-KDIGO.** Section 2: AKI Definition. Kidney Int Suppl. 2012;2:19-36. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/kisup.2011.32

21. **Feigin RD, Anderson DC.** Human leptospirosis. CRC Crit Rev Clin Lab Sci. 1975;5:413-67.

22. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 52 de 2010 (26 de diciembre al 1 de enero de 2011). Fecha de consulta: julio 26 de 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2010%20Boletin%20epidemiologico_Semana%2052_.pdf

23. **Katz AR, Ansdell VE, Effler PV, Middleton CR, Sasaki DM.** Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998. Clin Infect Dis. 2001;33:1834-41. http://dx.doi.org/10.1086/324084

24. **Yusti D, Arboleda M, Agudelo P.** Factores de riesgo sociales y ambientales relacionados con casos de leptospirosis de manejo ambulatorio y hospitalario, Turbo, Colombia. Biomédica. 2013;33(Supl.1):117-29. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.1457

25. **Herrmann-Storck C, Saint-Louis M, Foucand T, Lamaury I, Deloumeaux J, Baranton G, *et al*.** Severe leptospirosis in hospitalized patients, Guadeloupe. Emerg Infect Dis. 2010;16:331-4. http://dx.doi.org/10.3201/eid1602.090139

26. **Amilasan AS, Ujiie M, Suzuki M, Salva E, Belo MC, Koizumi N, *et al*.** Outbreak of leptospirosis after flood, the Philippines, 2009. Emerg Infect Dis. 2012;18:91-4. http://dx.doi.org/10.3201/eid1801.101892

27. **Thipmontree W, Suputtamongkol Y, Tantibhedhyangkul W, Suttinont C, Wongswat E, Silpasakorn S.** Human leptospirosis trends: Northeast Thailand, 2001-2012. Int J Environ Res Public Health. 2014;11:8542-51. http://dx.doi.org/10.3390/ijerph110808542

28. **Sánchez-Montes S, Espinosa-Martínez DV, Ríos-Muñoz CA, Berzunza-Cruz M, Becker I.** Leptospirosis in Mexico: Epidemiology and potential distribution of human cases. PLoS One. 2015;10:e0133720. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0133720

29. **Daher EF, Lima RS, Silva Júnior GB, Karbage NN, Kataoka RS, Carvalho Júnior PC, *et al*.** Clinical presentation of leptospirosis: A retrospective study of 201 patients in a metropolitan city of Brazil. Braz J Infect Dis. 2010;14:3-10. http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702010000100002

30. **Chidambaram N, Ramanathan N, Anandi V, Sasikala S, Innocent DJ, Sarayu L.** Leptospirosis: Clinical presentation and correlation with serovars. J Commun Dis. 2007;39:105-8.

31. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 47 de 2013 (17 al 23 de noviembre de 2013). Fecha de consulta: 26 de julio del 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2013%20Boletin%20epidemiologico%20Semana%2047.pdf

32. **Ciceroni L, Stepan E, Pinto A, Pizzocaro P, Dettori G, Franzin L, *et al*.** Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. Eur J Epidemiol. 2000;16:79-86.

33. **Rodríguez-Vidigal FF, Vera-Tomé A, Nogales-Muñoz N, Muñoz-García-Borruel M, Muñoz-Sanz A.** Leptospirosis in South-western Spain. Rev Clin Esp. 2014;214:247-52. http://dx.doi.org/10.1016/j.rce.2014.02.009

34. **Spichler A, Athanazio D, Buzzar M, Castro B, Chapolla E, Seguro A, *et al*.** Using death certificate reports to find severe leptospirosis cases, Brazil. Emerg Infect Dis. 2007;13:1559-61. http://dx.doi.org/10.3201/eid1310.070150

35. **Goswami RP, Goswami RP, Basu A, Tripathi SK, Chakrabarti S, Chattopadhyay I.** Predictors of mortality in leptospirosis: An observational study from two hospitals in Kolkata, eastern India. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2014;108:791-6. http://dx.doi.org/10.1093/trstmh/tru144

36. **Edwards CN, Nicholson GD, Hassell TA, Everard CO, Callender J.** Penicillin therapy in icteric leptospirosis. Am J Trop Med Hyg. 1988;39:388-90.

37. **McClain BL, Ballou WR, Harrison SM, Steinweg DL.** Doxycyline therapy for leptospirosis. Ann Intern Med. 1984;100:696-8. http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-100-5-696

38. **Watt G, Padre LP, Tuazon ML, Calubaquib C, Santiago E, Ranoa CP, *et al.*** Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. Lancet. 1988;1:433-5.

39. **Brett-Major DM, Coldren R.** Antibiotics for leptospirosis. Cochrane Database Syst Rev. 2012;2:CD008264. http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD008264.pub2

Biomédica 2017;37:68-78
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3051

ARTÍCULO ORIGINAL

Riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas por intrusión de triatominos y mamíferos silvestres en Bucaramanga, Santander, Colombia

Marlene Reyes[1,2,3], Ángela Torres[2,4], Lyda Esteban[1,2], Mónica Flórez[1,2,5], Víctor Manuel Angulo[1,2]

[1] Unión Temporal Red Chagas Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Grupo CINTROP, Universidad Industrial de Santander, Piedecuesta, Colombia
[3] Maestría en Química Ambiental, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia
[4] Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia
[5] Doctorado Interfacultades en Salud Pública, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La notificación de triatominos en las viviendas de algunos barrios de Bucaramanga motivó la realización de este estudio.
Objetivo. Evaluar la intrusión de triatominos y mamíferos, así como algunos factores de riesgo para la enfermedad de Chagas en viviendas urbanas.
Materiales y métodos. En un barrio de Bucaramanga, Santander, se recolectaron triatominos mensualmente durante un año con participación comunitaria mediante búsqueda manual en el alumbrado público, y el uso de trampas de luz, cebo animal y atrayentes químicos en el bosque cercano. Los reservorios se recolectaron con trampas cebadas. Los insectos y mamíferos se determinaron y examinaron para establecer su infección natural. Los factores de riesgo de las viviendas se midieron mediante una encuesta sobre factores sociales y ambientales.
Resultados. Se recolectaron 11 adultos de *Panstrongylus geniculatus* y 63 de *Rhodnius pallescens* en el bosque, en zonas de recreación en el peridomicilio y en el domicilio, incluidas dos hembras y 21 ninfas de *R. pallescens* en dormitorios. Se capturaron dos ejemplares de *Didelphis marsupialis* en el bosques adyacente. De los 11 individuos de *P. geniculatus* capturados, se examinaron nueve, de los cuales cinco fueron positivos para *Trypanosoma cruzi* (56 %); de los 63 individuos de *R. pallescens* capturados, se examinaron ocho, cuatro de los cuales fueron positivos para *T. cruzi* (50 %). De dos especímenes de *D. marsupiales* capturados, uno fue examinado y se encontró que era positivo para *T. cruzi*. No se pudo establecer un factor de riesgo significativo, sin embargo, las viviendas con reporte de triatominos se encontraban más cerca del bosque adyacente.
Conclusiones. El hallazgo de especies de triatominos intrusivas y de mamíferos con *T. cruzi* en el domicilio y el peridomicilio, así como en los bosques periurbanos, demuestra el riesgo de infección en las poblaciones que habitan en viviendas urbanas adyacentes a los ecótopos donde se mantiene el ciclo silvestre.

Palabras clave: Triatominae; enfermedad de Chagas; área urbana; *Didelphis*; riesgo; Colombia.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3051

Risk of transmission of Chagas disease by intrusion of triatomines and wild mammals in Bucaramanga, Santander, Colombia

Introduction: Notice of triatomines in dwellings of some neighborhoods in Bucaramanga motivated the realization of this study.
Objetive: To evaluate the intrusion of triatomines and mammals, as well as some risk factors in urban dwellings.
Materials and methods: Triatomines were collected in a neighborhood in Bucaramanga, Santander, on a monthly basis during one year with participation of the community. Collection included manual search in lamp posts, use of light traps, animal bait, and chemical attractants in nearby forests. Reservoirs were

Contribución de los autores:
Marlene Reyes: propuesta inicial, diseño metodológico, ejecución del trabajo de campo y encuestas de factores de riesgo, recopilación y análisis de los datos y escritura del manuscrito
Ángela Torres: diseño metodológico y ejecución del trabajo de campo, encuestas de factores de riesgo y trabajo de laboratorio
Lyda Esteban: apoyo en el diseño del método de muestreo
Mónica Flórez: diseño de métodos de captura, diseño y ejecución del análisis de factores de riesgo, análisis y escritura del manuscrito
Víctor Manuel Angulo: asunción de responsabilidad en todos los aspectos del manuscrito, revisión crítica del contenido y escritura del manuscrito

collected with bait traps. Insects and mammals were identified and examined in order to determine their natural infection. Risk factors in homes were assessed by means of a social-environmental survey.
Results: Eleven adult specimens of *Pastrongylus geniculatus,* as well as 63 of *Rhodnius pallescens* were collected in the forest, recreational peridomiciliary areas, and houses. Even two females and 21 nymphs of *R. pallescens* were found in bedrooms. Two specimens of *Didelphis marsupialis* were captured in neighboring forests. Out of the eleven *P. geniculatus* captured, nine were examined. Of these, five were positive for *Trypanosoma cruzi*. It was not possible to establish a significant risk factor; however, the dwellings with report of triatomines were located nearer to the adjacent forest.
Conclusions: The finding of intrusive triatominae species and mammals with *T. cruzi* in intradomiciliary and peridomiciliary areas and periurban forests prove the potential risk to acquire infection from these populations that dwell in urban housing adjacent to these ecotopes where the sylvan cycle is kept.

Key words: Triatominae; Chagas disease; urban area;*Didelphis*; risk; Colombia.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3051

La enfermedad de Chagas causada por *Trypanosoma cruzi* es una de las enfermedades desatendidas más importantes de América Latina. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente, 6 millones de personas están infectadas en 21 países de Latinoamérica (1).

En Colombia, la fase exploratoria y la intervención que se llevaron a cabo entre 1996 y 1999 en el marco del programa nacional de prevención y control de la enfermedad de Chagas, permitió establecer la distribución geográfica de los vectores, las especies domiciliadas y la seroprevalencia en niños menores de 15 años en zonas infestadas (2). La transmisión vectorial de *T. cruzi* al hombre se ha considerado la principal vía de infección, adquirida por contacto con heces infectadas de triatominos domiciliados. En este contexto, se desarrolló un protocolo de control que logró la disminución de la infestación de triatominos en las zonas detectadas (3).

Sin embargo, los reportes de brotes de casos agudos de la enfermedad en ausencia de triatominos domiciliados en varias zonas del país, han centrado la atención en la transmisión por vía oral (4-6). La presencia de triatominos silvestres y mamíferos sinantrópicos, y las visitas ocasionales a las viviendas cercanas a los bosques que albergan los ecótopos naturales de estos animales, permiten inferir una conexión entre el ciclo silvestre y el doméstico. Esta situación pone de manifiesto un riesgo para los habitantes de áreas urbanas, lo cual requiere la atención de los programas de prevención y control de los servicios de salud del país (7-13).

Es por esto que, en el enfoque del riesgo establecido para el control de la transmisión vectorial de la infección y de la enfermedad de Chagas, se advierte que no se puede tratar de una misma manera aquello que es desigual. La extensión del área endémica, la variedad de vectores con comportamientos diversos y las múltiples variables que intervienen y determinan diferentes patrones de transmisión, revelan la necesidad imperiosa de adoptar un manejo del riesgo y del control vectorial específicos en cada zona (14-16).

Asimismo, es importante considerar que los triatominos silvestres actúan como especies invasoras que pueden llegar a nuevas áreas mediante la migración natural, pero a menudo son introducidos en el curso de las actividades humanas que perturban sus ecosistemas. Cabe señalar que algunos de estos insectos podrían iniciar un proceso de domiciliación, el cual se ha hecho evidente por el aumento de la intrusión en las viviendas y el contacto con sus habitantes y con los animales domésticos, especialmente en aquellas zonas colindantes con regiones boscosas (17-20).

Panstrongylus geniculatus es una especie de hábitos silvestres y amplia distribución en América Latina. Es frecuente recolectarlo en el peridomicilio y dentro de las viviendas en zonas rurales y urbanas de Colombia y Venezuela. Su periodo completo de desarrollo es de 128 a 171 días en condiciones de laboratorio, aunque en otros estudios se ha mencionado una duración de hasta dos años (21). Esta especie se considera euritérmica, pues se puede adaptar a ecótopos muy secos o muy húmedos y está presente en una gran variedad de hábitats silvestres, como madrigueras o sitios de reposo

Correspondencia:
Marlene Reyes, Grupo CINTROP, Universidad Industrial de Santander, Km 2 Sede UIS, Vía El Refugio-Guatiguará, Piedecuesta, Colombia
Teléfono:(577) 634 4000, extensión 3526
marejez1@hotmail.com

Recibido: 11/11/15; aceptado: 31/05/16

de armadillos, zarigüeyas, roedores, murciélagos y aves, en huecos de árboles, en bromelias y en palmas (22-24).

Rhodnius pallescens es una especie considerada vector primario en Panamá y, secundario en varios países de Centroamérica y en la región Caribe y el Magdalena medio en Colombia. La duración promedio del desarrollo del huevo hasta el quinto estadio de ninfa es de 128,6 días (25). La especie tiene un gran potencial para invadir y colonizar las viviendas humanas a donde los insectos se ven atraídos por la luz artificial en áreas urbanas y rurales; allí colonizan estructuras como gallineros, palomares y porquerizas en el peridomicilio. Habita ecótopos silvestres, especialmente en palmas, y refugios aéreos y terrestres de varias especies de mamíferos, roedores y aves (26-29).

Por otro lado, el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* de 180 especies de mamíferos silvestres y domésticos de varios órdenes que habitan en Centroamérica y Suramérica ha evidenciado el riesgo que representa la cercanía de estos animales que actúan como reservorios del parásito. En este contexto, es necesario centrar la atención en el orden de los marsupiales y el género *Didelphis,* el cual es reconocido por su comportamiento sinantrópico, ya que visita o anida en el peridomicilio o en el domicilio en zonas rurales o urbanas, lo cual lo expone a picaduras de triatominos silvestres o domésticos (10,12,30,31).

Durante años, las comunidades han recolectado individuos de estas dos especies de triatominos en viviendas periféricas de diferentes barrios de Bucaramanga, incluida la urbanización donde se presentó un brote de la enfermedad de Chagas, probablemente por transmisión oral (13). Dichos especímenes han sido enviados a los laboratorios locales de referencia (4,13).

Esta notificación constante de triatominos hallados en las viviendas, y la reciente aparición de brotes de la enfermedad aguda de Chagas de posible transmisión oral debido a la contaminación de alimentos, en los cuales se han incriminado estas especies de triatominos y mamíferos como posibles vectores de *T. cruzi,* motivó la realización de este estudio en la urbanización Villa del Prado y la zona boscosa colindante (Cañada del Loro) en Bucaramanga.

Los objetivos del estudio fueron: 1) determinar la intrusión y la posible domiciliación de los insectos vectores; 2) determinar la presencia de mamíferos silvestres en el domicilio y el peridomicilio de las viviendas; 3) evaluar los métodos de captura de los triatominos silvestres; 4) determinar la infección natural de los vectores mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y 5) determinar los factores de riesgo de la intrusión de los triatominos en las viviendas.

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en una zona urbana en donde la comunidad había reportado frecuentemente la aparición de triatominos. El área de estudio (Villa del Prado: 7°6’ 44,53” N y 73°7’ 47,15” 0) está en la periferia de la escarpa occidental de Bucaramanga, capital del departamento de Santander. Durante el periodo de estudio, la temperatura promedio fue de 24,6 °C, la humedad, de 18,4 %, y la precipitación, de 98,7 mm, con dos períodos lluviosos y dos de menor precipitación. La urbanización tiene 196 viviendas de estrato tres, construidas con planos aprobados por la Oficina de Planeación Municipal; cuentan con dos pisos conectados entre sí por una escalera interior paralela, con paredes fabricadas en ladrillo frisado, estucadas y pintadas, pisos en cerámica, y techos machihembrados de teja de barro. La urbanización cuenta con una zona social para la recreación que consta de una cancha de futbol y una de baloncesto con piso de cemento, una zona de juegos infantiles, un pequeño kiosco, así como una zona de parqueadero con iluminación eléctrica y una portería con vigilancia.

La urbanización Villa del Prado colinda con una zona boscosa, la Cañada del Loro, la cual presenta un suelo de pendientes altas en el borde de la escarpa, con salida de acuíferos por drenaje natural (quebradas), y recibe aguas residuales durante su trayecto (figura 1). Esta zona fue declarada reserva forestal protegida en el 2013 por la Corporación de la Meseta de Bucaramanga (CDMB), con el fin de preservar los residuos boscosos de los ecosistemas de bosque seco tropical para el restablecimiento de su estado natural. La zona presenta vegetación abundante, con variedad de especies, entre ellas, árboles gallineros, sarrapios, búcaros, mangos y varias especies de palmas, como la palma areca y la palma real. Entre las especies animales, se cuentan zarigüeyas, ñeques, ardillas, una gran variedad de aves y reptiles (boas y corales), además de otras comunes cerca de los sitios poblados, como gallinazos y roedores (32,33).

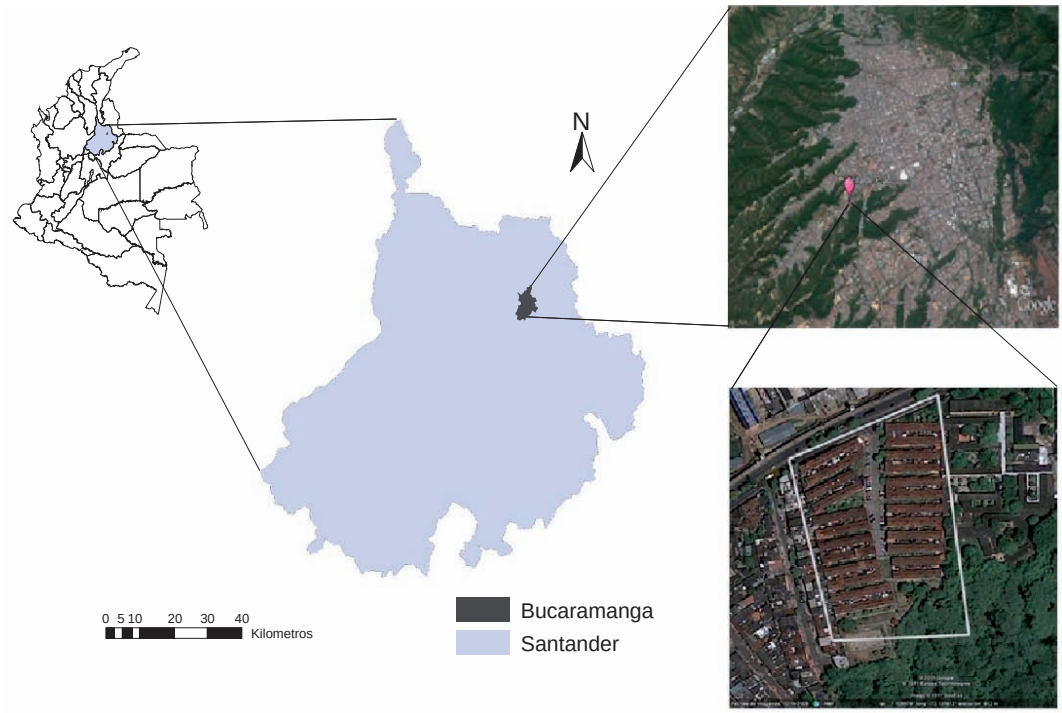


Figura 1. Ubicación del área de estudio en la urbanización Villa del Prado y Cañada del Loro, Bucaramanga, Santander
Fuente: *Google Maps*

Captura de triatominos

Durante tres días consecutivos cada mes a lo largo de un año (desde febrero de 2011 hasta enero de 2012), se utilizaron los siguientes métodos para la captura de triatominos: vigilancia comunitaria, trampas Angulo (27), trampas Noireau (34), trampas con atrayentes químicos (35,36), trampas Shannon y la captura manual en el alumbrado público. Los días de muestreo se eligieron teniendo en cuenta la fase de transición de luna menguante a luna nueva, según lo sugerido por Castro, *et al.* (37).

La vigilancia comunitaria se llevó a cabo con un funcionario de la Secretaría de Salud Municipal y el aval de la junta de acción comunal de la urbanización; se dio una charla a los habitantes con el fin de darles a conocer aspectos de la enfermedad de Chagas, sensibilizarlos sobre la recolección de triatominos e informarles sobre los cuidados que debían tener durante la captura de los insectos; posteriormente, se les entregaron los frascos rotulados para su captura.

En cuanto a las trampas Angulo (con gallina como cebo) y las Noireau (con ratón como cebo), se instalaron entre cuatro y seis de cada una. Las trampas Angulo se instalaron en palmas y árboles con fronda abundante, usando la metodología del vecino más cercano para su ubicación, y las de Noireau, en sitios como troncos caídos, raíces de árboles, cuevas en las rocas, madrigueras y nidos de gallinazos.

También, se instalaron ocho trampas Noireau con atrayentes químicos contenidos en viales de 2 ml con agujeros en la tapa y adheridos a las paredes de la trampa. Cada vial contenía 1,5 ml de nonanal (142,4 g/mol), de heptanal (114,18 g/mol), de benzaldehído (106,12 g/mol) y de alcohol isoamílico (88,15 g/mol) (35,36). Estas trampas se instalaron en sitios similares a los ya mencionados. Todas ellas se instalaron al atardecer y se revisaron al cabo de 12 horas. El material entomológico recolectado se almacenó en frascos plásticos debidamente rotulados.

En cuanto a las trampas de luz del tipo Shannon, se instalaron tres en un transecto lineal, diagonal entre la cancha y el bosque de la Cañada del Loro, separadas cada una por 50 m. En cada punto se ubicaron entre dos y tres personas para la captura de insectos en el horario de 6 p.m. a 10 p.m.

Para la captura manual en el alumbrado público, una persona revisaba y recolectaba los insectos de forma manual cerca a la farola del alumbrado público de las canchas de fútbol y de baloncesto,

y en la zona de los juegos infantiles, en el horario de 6 p.m. a 10 p.m. Los insectos recolectados se clasificaron según su sexo y estadio, con la ayuda de la clave de Lent y Wygodzinski (23).

Captura de mamíferos

Para la captura de mamíferos, se instaló durante dos días una trampa Tomahawk con mango como atrayente a 8 m de una vivienda en el bosque adyacente. Se hizo el xenodiagnóstico con 20 ninfas de estadio V de *R. prolixus* en un mamífero capturado que luego se liberó.

Infección natural

La determinación de la infección natural por *T. cruzi* en *P. geniculatus* y *R. pallescens* se hizo mediante observación directa de las heces en el microscopio y posterior confirmación por PCR. La extracción del ADN se ajustó al protocolo recomendado por Miller, *et al.* (método de precipitación salina). La amplificación del ADN nuclear de *T. cruzi* se hizo siguiendo el método de Moser, *et al*. Para la reacción se utilizaron los iniciadores TCZ1 5` CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT-3` y TCZ25`-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3`, los cuales amplifican una región repetida de 188 pb del ADN nuclear satelital de *T. cruzi*. En la PCR se utilizaron 0,4 µl/ml de deoxinucleósido trifosfato (dNTP), 0,1 µl/ml del iniciador, 1,2 µl/ml de cloruro de potasio (MgCl) y 0,12 µl/ml de ADN Taq polimerasa Tucan. La amplificación se hizo en un termociclador a una temperatura inicial de 94 °C durante 10 minutos, seguida de 30 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, a 55 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 30 segundos, y un ciclo final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta (38,39).

Determinación de factores de riesgo

Para caracterizar los posibles factores de riesgo de la presencia de triatominos en áreas urbanas, se hizo una encuesta domiciliaria sobre factores sociales y ambientales, similar a la propuesta por Reyes-Lugo (18), con la idea de determinar si factores como las características físicas de la vivienda (color de la fachada), la densidad de habitantes y de huéspedes animales, la cercanía a ambientes silvestres, la presencia de atrayentes como fuentes de luz y el nivel de conocimientos de la comunidad sobre la endemia favorecían la intrusión de triatominos en las viviendas.

Para calcular la distancia de las viviendas al bosque y al alumbrado público, se utilizó una imagen satelital del 2009 obtenida de *Google Earth*, cuya georreferenciación se hizo con el programa Idrisi Taiga para digitalizar la ubicación de las viviendas y del alumbrado público (figura 2). Para identificar los factores de riesgo, se usó la prueba de regresión logística, teniendo en cuenta la presencia o ausencia de triatominos en las viviendas, y según los reportes acumulados en el área de estudio y las variables mencionadas.

Consideraciones éticas

Este estudió contó con la revisión y aprobación del Comité de Ética de la Fundación Cardiovascular de Colombia. La manipulación de los insectos y la bioseguridad del estudio se rigieron por la Resolución 008430 de 1993, del Ministerio de Salud de la República de Colombia. Asimismo, el proyecto hizo uso del permiso de recolección tramitado por la Universidad Industrial de Santander ante la Corporación de Defensa de la Meseta de Bucaramanga, y de la autorización para el uso de fauna y flora reglamentada en el Decreto 1376 de 2013 con fines de investigación científica no comercial, por el cual se regula la investigación científica sobre diversidad biológica. De igual manera, el trabajo se acogió a la Ley 1581 de 2012 sobre protección de los datos personales en Colombia.

Resultados

Recolección de triatominos

Las especies de triatominos recolectadas fueron *P. geniculatus* y *R. pallescens*. Se recolectaron ocho hembras y tres machos de *P. geniculatus*, cinco de ellos en la cancha, cuatro en las viviendas y dos en el bosque. El tiempo de respuesta de la comunidad entre el hallazgo de un insecto semejante a un triatomino y la entrega al encargado de recogerlos fue corto, así que el mayor número de triatominos fue recolectado por la comunidad (55 %), seguido por el recolectado en el alumbrado público (cuadro 1).

De *R. pallescens* se recolectaron 63 individuos, nueve en la cancha y en el parqueadero, 27 en las viviendas y 27 en palmas reales (*Attalea butyracea*) con la trampa Angulo. En una vivienda se encontró una hembra de *R. pallescens* y 18 ninfas de primer estadio en una caja de cartón debajo de una cama, y en otra habitación de la misma vivienda, una hembra y tres ninfas de segundo estadio (cuadro 2). En cinco viviendas de la urbanización se reportaron triatominos durante el periodo de estudio y solo en una vivienda se recolectaron las dos especies (6).

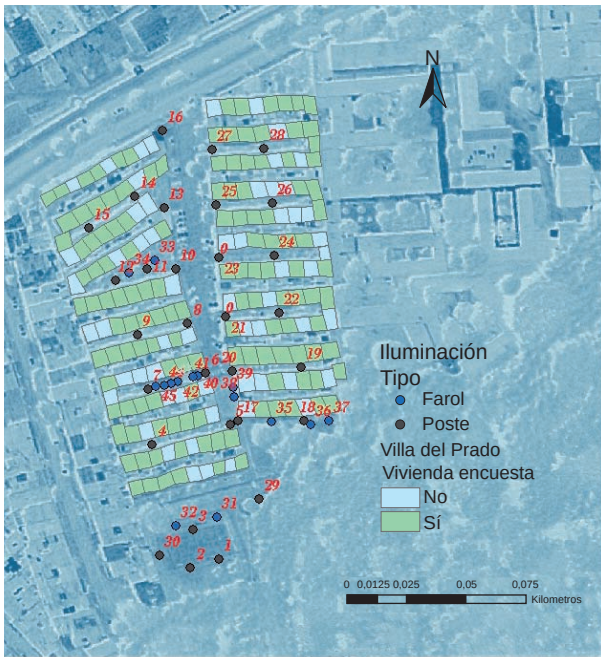


Figura 2. Viviendas encuestadas de la urbanización Villa del Prado y ubicación del alumbrado público. Fuente: *Google Maps*

Captura de mamíferos

La trampa instalada permitió la captura de dos mamíferos *Didelphis marsupialis*, un adulto y una cría. El mamífero adulto fue examinado y se encontró positivo para flagelados. Después de examinados, los animales fueron liberados en la Cañada del Loro.

Infección natural

Se procesaron nueve muestras de *P. geniculatus* y ocho de *R. pallescens*. Entre las muestras de *P. geniculatus*, cinco fueron positivas por examen directo y por PCR (56 %). Entre las de *R. pallescens*, el examen directo resultó positivo en cinco muestras (62,5 %), de las cuales cuatro se confirmaron por PCR.

Determinación de factores de riesgo

La encuesta se hizo en 136 (con 560 habitantes, aproximadamente) de las 190 viviendas de la urbanización (figura 2). No se pudo establecer asociación entre las variables en estudio, probablemente debido al bajo número de viviendas (siete) en donde se había reportado la presencia de triatominos (cuadro 3); sin embargo, en las viviendas más cercanas a la Cañada del Loro se detectó un mayor riesgo de intrusión de triatominos. Los animales domésticos más frecuentes fueron los perros, seguidos de las aves y los gatos.

Discusión

En este estudio se pudieron comprobar dos situaciones de gran importancia en la epidemiología de la enfermedad de Chagas en Colombia: en primer lugar, la presencia del ciclo de transmisión silvestre de *T. cruzi* en la periferia de una zona urbana, rodeada de vegetación conservada; y, en segundo lugar, la intrusión de triatominos en el domicilio y, en zonas de recreación urbanas cercanas a viviendas, la presencia frecuente de triatominos y mamíferos silvestres, como *P. geniculatus*, *R. pallescens* silvestres y *D. marsupialis*, infectados con *T. cruzi*, en Bucaramanga. El hallazgo de reservorios mamíferos y de triatominos infectados con *T. cruzi* en el bosque adyacente a las viviendas en los barrios periféricos de una gran ciudad, alerta sobre el riesgo de transmisión urbana del parásito en zonas consideradas como no endémicas.

El desarrollo urbanístico de Bucaramanga ha propiciado la construcción de viviendas en la periferia de la escarpa, adyacentes a los ambientes naturales

Cuadro 1. Individuos de *P. geniculatus* recolectados por diferentes métodos en la urbanización Villa del Prado, Bucaramanga

Método de captura	Hábitat	Lugar de captura	Estadio	Total
Vigilancia comunitaria	Domicilio	Habitación	2 HV	6
		Sala	1 MV	
		Entrada de la vivienda	1 MM	
		Sala	1 MM	
		Habitación	1 MM	
Trampa Angulo con cebo animal	Extradomicilio	Bosque (Cañada del Loro)	0	0
Trampa Noireau con cebo animal	Extradomicilio	Bosque (Cañada del Loro)	0	0
Trampa Noireau con atrayente químico	Extradomicilio	Bosque (Cañada del Loro)	0	0
Trampa de luz (Shannon)	Extradomicilio	Bosque (Cañada del Loro)	2 HV	2
Alumbrado público	Peridomicilio	Jardín de una vivienda	1 HV	3
		Canchas de fútbol y de baloncesto	2 MV	
Total				11

M: macho; H: hembra; V: vivo; M: muerto

circundantes que han recuperado su vegetación. Esto ha permitido la aparición y el mantenimiento de un sinnúmero de ecótopos, los cuales albergan animales de todos los órdenes, incluidos triatominos y huéspedes mamíferos, como faras o zarigüeyas, y grandes y pequeños roedores, como ñeques y ratas, los cuales pueden mantener el ciclo silvestre de la enfermedad de Chagas y son avistados ocasionalmente por la comunidad en las cercanías de sus viviendas (32,33).

Se ha reportado la presencia de *P. geniculatus*, *R. pallecens* y de mamíferos didélfidos, como especies intrusivas en zonas rurales de muchos países y, más recientemente, en zonas urbanas, y se los ha asociado con brotes de la enfermedad aguda de Chagas transmitida por vía oral debido a la contaminación de alimentos (6,11,13,40). En 2003 y 2008 ocurrieron dos brotes en la ciudad de Bucaramanga, el primero de los cuales se presentó en una zona de la periferia con bosque adyacente ubicada a dos kilómetros del área de estudio (4,5,13).

Es importante resaltar que las especies silvestres no se consideran muy aptas para la transmisión, y su nivel de adaptación a la vivienda humana es clave en el desarrollo de su competencia vectorial

Cuadro 2. Individuos de *R. pallescens* recolectados mediante diferentes métodos en la urbanización Villa del Prado, Bucaramanga

Método de captura	Hábitat	Lugar de captura	Estadio	Total
Vigilancia comunitaria	Domicilio	Debajo de la cama	1 MM	27
		Cortina de la sala	1 HV	
		Puerta de vivienda	1 MM	
		Escalera al 2º piso	1MM	
		Debajo de la cama	2 HV,18 N1, 3 N2	
	Domicilio	Gruta de la Virgen	1 MV	8
		Canchas de fútbol y de baloncesto	3 MM, 4 MV	
Trampa Angulo con cebo animal (gallina)	Extradomicilio	Bosque, palmas *(Attalea butyracea)*	5 M,1 H,1 N5, 2 N4, 5 N3, 8 N2, 6 N1	27
Trampa Noireau con cebo animal (ratón)	Extradomicilio	Bosque (Cañada del Loro)	0	0
Trampa Noireau con atrayente químico	Extradomicilio	Bosque (Cañada del Loro)	0	0
Alumbrado público	Peridomicilio	Canchas de fútbol y de baloncesto	1MV	1
Total				63

N1-5: ninfas de primero a quinto estadios; M: macho; H: hembra; V: vivo; M: muerto

Cuadro 3. Factores de riesgo incluidos en la encuesta sobre factores sociales y ambientales determinantes de la presencia de triatominos en las viviendas del área de estudio

Variable	Descripción	Razón de probabilidades	$IC_{95\%}$	p
Habitantes		1,474	0,819-2,651	0,196
Habitantes	1-3			0,089
	4-7	0,025	0,001-0,756	0,034
	>8	0,049	0,003-0,942	0,046
Animales	Ausencia			
	Presencia	1,179	0,229-6,072	0,844
Color exterior	Blanco-gris			0,517
	Amarillo	1,469[12]	-	1
	Azul	5,876[12]	-	1
	Rojo	0,991	-	1
Color interior	Blanco-gris			0,577
	Amarillo	1,396[12]	-	1
	Azul	5,047[12]	-	1
	Rojo	0,922	-	1
Color de la iluminación	Sin iluminación			
	Amarillo incandescente	0,000	-	1
	Blanco incandescente	0,000	-	1
	Blanco fluorescente	1,400	0,148-13,242	0,769
	Otro	0,000	-	1
Distancia a la cañada		0,973	0,950-0,996	0,022
Distancia al alumbrado público		0,914	0,773-1,081	0,294

(41). Sin embargo, la presencia de triatominos, así sean pocos, en el domicilio puede originar el riesgo de transmisión por contaminación directa de la piel y de las mucosas o de los alimentos con heces infectadas del insecto, y originar brotes agudos de Chagas, como se ha reportado en Colombia (4-6,42).

El hallazgo de *P. geniculatus* y *R. pallescens* en el domicilio, el peridomicilio y en zonas aledañas, así como el hallazgo de una pequeña colonia de *R. pallescens* y la entrega de insectos de esta especie capturados por la comunidad en las habitaciones de dos personas, quienes refirieron haber sido picadas y presentaron las marcas de las picaduras en sus cuerpos, son señales del desplazamiento de estos huéspedes desde los ambientes silvestres periurbanos al ambiente doméstico de la zona urbana, lo cual acrecienta la posibilidad del inicio de un proceso de domiciliación o contaminación de alimentos con *T. cruzi* y, por ende, el riesgo de transmisión del parásito.

La captura de *R. pallescens* y *P. geniculatus* con trampas Angulo y Shanon, respectivamente, demuestra la eficiencia del uso de cebo animal en las primeras y de la luz blanca y el cebo humano en las segundas, lo cual implica su dispersión activa. Por otro lado, la captura manual en postes del alumbrado público demostró que la luz eléctrica usada en los exteriores de la urbanización y en las viviendas tiene un papel importante en la invasión de triatominos silvestres en los ambientes domésticos y, consecuentemente, en el riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas (27,36).

Aunque se presentó deterioro de los insectos recolectados por la comunidad, lo cual sucede a veces (43), se pudo determinar la infección natural por *T. cruzi* en *P. geniculatus* y *R. pallescens,* con valores similares a los reportados en otros estudios (18,44).

El estudio permitió determinar que la cercanía de las viviendas al bosque constituye un posible factor de riesgo para la intrusión de triatominos en las urbanizaciones ubicadas en la periferia de la escarpa, aunque no fue posible calcular la significación estadística debido al tamaño de la muestra. Por ello, es recomendable ampliar la muestra a otros barrios similares, con el fin de determinar dicha significación. En Venezuela, Reyes-Lugo (18) relacionó esta misma condición con la intrusión de *P. geniculatus*, así como la disminución de la cobertura vegetal del entorno, el número de animales domésticos y la iluminación nocturna (18).

Sin duda alguna, la modificación de los ecótopos naturales por acción antrópica, en los cuales se mantiene el ciclo enzoótico de *T. cruzi*, modifica el ciclo epidemiológico de la enfermedad (45), lo cual se ve propiciado con la expansión de los asentamientos humanos en espacios naturales circundantes que recuperan su entorno verde en ciudades en continuo crecimiento, como ocurre en muchas de Colombia. La expansión de estos asentamientos hacia la periferia trae como consecuencia la disminución de los refugios y de las fuentes de alimento de los vectores y los reservorios en su hábitat natural. Si a esto agregamos los estímulos para su migración, como la iluminación y la agregación de viviendas con presencia de potenciales huéspedes, se pueden estar configurando nuevas circunstancias de transmisión, en este caso, urbana, lo cual se habría evidenciado en los brotes de casos agudos de la enfermedad de Chagas en zonas no endémicas o de baja endemia, caracterizadas por la ausencia de triatominos domiciliarios, en Colombia (4-6,13).

La notificación y la recolección de triatominos de las dos especies por parte de la comunidad en este estudio, demuestran de forma inequívoca la importancia de la incorporación de la participación comunitaria en la vigilancia epidemiológica, como se ha comprobado al comparar métodos de vigilancia entomológica (46,47), así como de estrategias de prevención y control basadas en sistemas sostenibles de vigilancia que permitan la notificación de la presencia de vectores, de los potenciales huéspedes y de casos febriles que podrían deberse a la enfermedad aguda de Chagas (40).

Ante el notable aumento de la intrusión de diferentes especies de triatominos silvestres inducido por acción antrópica y la ausencia de parámetros cuantitativos para clasificar las poblaciones de las diferentes especies y estimar el riesgo de este comportamiento, es necesario, como lo plantean Waleckx, *et al.* (48), redefinir los criterios de clasificación existentes y comprobar el riesgo con mediciones cuantitativas para orientar de mejor forma el diseño y la adopción de decisiones en los programas de control de vectores. El grado de intrusión y domiciliación debe establecerse en términos operativos, y considerarse en el diseño de las estrategias de control (41) y de un nuevo indicador para la medición de este comportamiento, como ya lo proponía Zeledón desde 1973 (45).

También, es necesario poner en marcha estrategias de control de triatominos y mamíferos intrusivos potencialmente infectados con *T. cruzi*, con base en la valoración del riesgo real. En un primer paso, estas podrían incluir el uso de barreras físicas de protección de la vivienda para impedir el ingreso de los insectos, de protección individual (mallas o toldillos impregnados con insecticidas) y de sustancias repelentes.

Por último, se recomienda adoptar un enfoque que involucre la participación de las comunidades en riesgo en el control vectorial, así como la educación sobre el manejo adecuado de alimentos para evitar la contaminación por *T. cruzi*, la eliminación de algunas prácticas, entre ellas, la disposición de residuos orgánicos en el bosque aledaño para evitar el acercamiento de especies silvestres como faras, ñeques y ardillas, y la detección temprana de casos febriles sospechosos de enfermedad aguda de Chagas y su atención temprana, actividades que deben incorporarse a los sistemas de alerta temprana (49), y que podrían disminuir y mitigar el riesgo de transmisión, y la mortalidad y letalidad de la infección.

Agradecimientos

A Cristian Fernando Moreno, por el trabajo comunitario en la urbanización Villa del Prado; a la Secretaría de Salud de Bucaramanga, por su apoyo en la vigilancia comunitaria y en las encuestas domiciliarias; al Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular de la Universidad Industrial de Santander, por la asesoría, el suministro de reactivos y el préstamo de equipos para las pruebas moleculares, y a la Red Chagas Colombia.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan no haber tenido ningún conflicto de intereses.

Financiación

Colciencias, proyecto N°110249326216, y Secretaría de Salud de Santander.

Referencias

1. **World Health Organization.** Chagas disease in Latin America: An epidemiological update based on 2010 estimates. Wkly Epidemiol Rec. 2015;6:33-44.
2. **Padilla JC.** Situación de la enfermedad de Chagas en Colombia. En: Guhl F, editor. Primer Taller Internacional sobre Control de la Enfermedad de Chagas. Bogotá: Universidad de los Andes; 2005. p. 19-24.
3. **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: Ministerio de la Protección Social-INS; 2010.
4. **Díaz ML, González CI.** Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. Rev Univ Ind Santander Salud. 2014;46:177-88.
5. **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
6. **Ríos J, Arboleda, M, Montoya AN, Alarcón EP, Parra 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
7. **Briceño-León R, Méndez-Galván J.** The social determinants of Chagas disease and the transformations of Latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:109-12. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007005000095
8. **Borges EC, Dujardin, JP, Schofield CJ, Romanha AJ, Diotaiuti L.** Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) in Ceara state, Northeastern Brazil. Acta Trop. 2005;93:119-26. http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.10.002
9. **Angulo VM.** Aspectos ecológicos de la enfermedad de Chagas en el oriente de Colombia. MVZ Córdoba. 2000;5:64-8.
10. **Herrera L.** Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Bol Mal Salud Amb. 2010;50:3-15.
11. **Valente S, Valente V, Neto H.** Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94:395-8. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000700077
12. **Travi B, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Gonçalves A, *et al*.** *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and *Leishmania* (Leishmania) *chagasi* in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1994;50:557-61.
13. **Ramírez JD, Montilla M, Cucunubá-Pérez 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
14. **Mundaray O, Palomo N, Querales M, De Lima A R, Contreras V, Graterol D, *et al.*** Factores de riesgo, nivel de conocimiento y seroprevalencia de enfermedad de Chagas en el municipio San Diego, Estado Carabobo. Venezuela. Salus. 2013;17:24-8.
15. **Hurtado LA, Calzada JE, Pineda V, González K, Santamaría AM, Cáceres L, *et al*.** Conocimientos y factores de riesgo relacionados con la enfermedad de Chagas en dos comunidades panameñas donde *Rhodnius pallescens* es el vector principal. Biomédica. 2014;34:260-70. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.2133
16. **Sanmartino M, Crocco L.** Conocimientos sobre la enfermedad de Chagas y factores de riesgo en comunidades epidemiológicamente diferentes de Argentina. Rev Panam Salud Pública. 2000;7:173-8. http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892000000300006

17. **Javit M, Traviezo V, Rodríguez L, Perdomo R.** Hallazgo de *Panstrongylus geniculatus* en urbanización de la zona este de Barquisimeto, estado Lara, Venezuela. REDVET. 2012;13:1-10.

18. **Reyes-Lugo M.** *Panstrongylus geniculatus* Latreille 1811 (Hemiptera : Reduviidae : Triatominae), vector de la enfermedad de Chagas en el ambiente domiciliario del centro-norte de Venezuela. Rev Biomed. 2009;20:180-205.

19. **Carrasco HJ, Torrellas A, García C, Segovia M, Feliciangeli MD.** Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring states, Venezuela. Int J Parasitol. 2005;35: 1379-84. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.05.003

20. **Wolff M, Castillo D.** Evidencias de domesticación y aspectos biológicos de *Panstrogylus geniculatus* (Latrelle, 1881) (Hemiptera: Reduviidae). Acta Entomol Chilena. 2000;24: 77-83.

21. **Wolff M, González C.** Ciclo de vida de *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) en condiciones de laboratorio. Caldasia. 1998;1:75-7.

22. **Carcavallo R, Rodríguez ME, Salvatella R, Curto de Casas SI, Sherlock IS, Galvão C, *et al.*** Habitats and related fauna. In: Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Jurberg J, Lent H, editors. Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1998. p. 561-600.

23. **Lent H, Wygodzinsky P.** Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. Bull Am Mus Nat Hist. 1979;163:123-520.

24. **Leite G, dos Santos C, Falqueto A.** Insecta, Hemiptera, Reduviidae, *Panstrongylus geniculatus*: Geographic distribution map. Check List. 2007;3:147-52.

25. **Flórez M, Angulo VM.** Cría masiva y uso de ninfas de *Rhodnius pallescens*, Barber, 1932 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) para ensayos biológicos. Rev Univ Ind Santander Salud. 2015;47:15-22.

26. **Organización Panamericana de la Salud.** Taller técnico de estudio sobre *Rhodnius pallescens*, su vigilancia y control. Panamá: OPS; 2002.

27. **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

28. **Salazar D, Calle J.** Caracterización ecoepidemiológica de *Rhodnius pallescens* en la palma *Attalea butyracea* en la región momposina (Colombia). Actual Biol. 2003;25:31-8.

29. **Jaramillo N, Schofield CJ, Gorla D, Caro-Riaño H, Moreno JE, Dujardin JP.** The role of *Rhodnius pallescens* as a vector of Chagas disease in Colombia and Panamá. Res Rev Parasitol. 2000;60:75-82.

30. **Aponte JD.** Una revisión de la biología del *Didelphis marsupialis* y su relación con el mal de Chagas y la leishmaniasis. Hipótesis. 2013;96-101. Fecha de consulta: 20 de marzo de 2016. Disponible en: http://hipotesis.uniandes.edu.co/hipotesis/images/stories/edesp2013pdf/Una%20revision%20de%20la%20biologia%20del.pdf

31. **Cantillo O, Chaverra D, Marcet P, Arboleda S, Triana O.** *Trypanosoma cruzi* transmission in a Colombian Caribbean region suggests that secondary vectors play an important epidemiological role. Parasit Vectors. 2014;7:381-90. http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-381

32. **Corporación Autónoma de la Meseta de Bucaramanga.** Acuerdo del Consejo Directivo Nº1246, Bucaramanga, Santander, Colombia. 31 de mayo de 2013. Fecha de consulta: 15 de agosto de 2015. Disponible en: http://acmineria.com.co/sites/default/files/regulations/Acuerdo%20CDMB%201246%20de%202013%20-%20DMI-SINAP_0.pdf

33. **Alcaldía Municipal de Bucaramanga, Santander.** Santander 2030. Diagnóstico dimensión biofísico ambiental territorial de Santander. Fecha de consulta: 15 de agosto de 2015. Disponible en: https://www.uis.edu.co/webUIS/es/investigacionExtension/documentos/docInteres/Tomo%20I%20Dimension%20Biofisica%20Ambiental.pdf

34. **Noireau F, Flores R, Vargas F.** Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999;93:13-4.

35. **Rojas MA.** Nuevas estrategias de vigilancia entomológica para el control vectorial de la enfermedad de Chagas. En: Guhl F, editor. Primer Taller Internacional sobre Control de la Enfermedad de Chagas. Bogotá D.C.: Universidad de los Andes; 2005. p. 60-8.

36. **Guerenstein PG, Guerin PM.** Olfactory and behavioural responses of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. J Exp Biol. 2001;204:585-97.

37. **Castro CM, Barret T, Santos W, Abad F, Rafael J.** Attraction of Chagas disease vectors (Triatominae) to artificial light sources in the canopy of primary Amazon rainforest. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105:1061-4. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000800019

38. **Miller S, Dykes D, Polesky H.** 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

39. **Moser D, Kirchhoff L, Donelson J.** Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J. Clin Microbiol. 1989;27:1477-82.

40. **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.

41. **Walter A.** Human activities and American trypanosomiasis. Review of the literature. Parasite.2003;10:191-204.

42. **Soto H, Tibaduiza T, Montilla M, Triana O, Suárez DC, 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

43. **Vásquez AM, Samudio FE, Saldaña A, Paz HM, Calzada JE.** Eco-epidemiological aspects of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* and their vector (*Rhodnius pallescens*) in Panamá. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004;46:217-22. http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652004000400008

44. **Reyes-Lugo M.** Bioecología de *Panstrongyus geniculatus*, vector de la enfermedad de Chagas en el centro-norte de Venezuela. Tribuna del Investigador. 2010;11:30-1.

45. **Zeledón R**. A new entomological indicator useful in epidemiological studies and in control campaigns against Chagas disease. Entomol Vect. 2003;10:269-76.

46. **Angulo VM, Esteban L, Luna KP.** *Attalea butyracea* próximas a las viviendas como posible fuente de infestación domiciliaria por *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) en los Llanos Orientales de Colombia. Biomédica. 2012;32: 277-85. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v32i2.430

47. **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;33:653-9. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i4.835

48. **Waleckx E, Gourbière S, Dumonteil E.**Intrusive *versus* domiciliated triatomines and the challenge of adapting vector control practices against Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110:324-38. http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760140409

49. **Angulo VM, Castellanos YZ, Flórez M, Esteban L, Pérez W, Farfán AE, *et al*.** Human Trypanosomiasis in the Eastern Plains of Colombia: New transmission scenario. Am J Trop Med Hyg. 2016;94:348-51. http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.15-0406

Biomédica 2017;37:79-85
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3293

ARTÍCULO ORIGINAL

Hallazgos patológicos en adenopatías de pacientes con infección por HIV

Federico Rodríguez-Vega[1], Miguel Botero[2], Jorge Alberto Cortés[1,3], Ángela Tobón[4]

[1] Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Departamento de Medicina Interna, Clínica CES, Medellín, Colombia
[3] Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
[4] Unidad de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia

Introducción. Las adenopatías son un hallazgo frecuente en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). El diagnóstico diferencial incluye infecciones, neoplasias malignas o cambios reactivos. No existen datos sobre su etiología en Suramérica.
Objetivo. Describir la etiología de la histopatología ganglionar en pacientes con HIV del Hospital La María de Medellín.
Materiales y métodos. Se evaluaron de manera retrospectiva historias clínicas de pacientes con HIV y linfadenopatías, a quienes se les había hecho biopsia por escisión de ganglio linfático entre junio de 2009 y octubre de 2011. Se registraron los datos de los resultados de las biopsias en cuanto al estado de inmunosupresión, el uso de tratamiento antirretroviral y el diagnóstico final de los pacientes.
Resultados. Se evaluaron 120 historias clínicas, con diagnósticos distribuidos así: 58 % de origen infeccioso, 32,5 % con cambios reactivos, 6,6 % de origen neoplásico y 2,5 % normales. El diagnóstico más frecuente fue la tuberculosis (48,3 %). En 14,1 % de los pacientes, la biopsia de ganglio linfático sirvió para detectar otra infección oportunista además de las encontradas en otros órganos.
Conclusión. La biopsia de ganglio linfático en pacientes con HIV es una herramienta útil que permite el diagnóstico de enfermedades infecciosas y neoplásicas graves, y que debería hacerse de rutina en todos los pacientes con adenopatías.

Palabras clave: enfermedades linfáticas; HIV; biopsia; infección oportunista; tuberculosis; histoplasmosis.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3293

Pathological findings in patients with HIV infection and lymphadenopathies

Introduction: Lymphadenopathy is a frequent clinical finding in HIV-infected patients. The differential diagnosis includes infection, malignancy or reactive changes. Currently, there are no data on this topic in the region.
Objectives: To describe the etiology of lymph node pathology in HIV-infected patients from the Hospital La María in Medellín, Colombia.
Materials and methods: The medical records of HIV-infected patients with lymphadenopathy who underwent excisional lymph node biopsy between June 2009 and October 2011 were retrospectively evaluated. The data were registered according to immune status, antiretroviral therapy and final diagnosis.
Results: The evaluation of 120 medical records revealed the following diagnosis distribution: 58% of the cases were attributable to infectious causes, 32.5% were attributable to reactive changes, 6.6% were attributable to neoplastic disease, and 2.5% were normal. The most frequent diagnosis was tuberculosis, which was found in 48.3% of the patients. The lymph node biopsy was useful for identifying additional opportunistic infections in different organs in 14.1% of the patients.
Conclusion: A lymph node biopsy in HIV-infected patients is a useful aid in the diagnosis of serious neoplastic and infectious diseases and should be routinely performed in such patients with lymphadenopathy.

Key words: Lymphatic diseases; HIV; biopsy; lymph node; opportunistic infections; tuberculosis; histoplasmosis.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3293

Contribución de los autores:
Federico Rodríguez-Vega y Miguel Botero: recolección de la información
Todos los autores participaron en la generación del proyecto, el desarrollo del protocolo, el análisis de la información y la escritura del manuscrito.

Según el Instituto Nacional de Salud, en el 2015 se registraron en Colombia 11.606 nuevos casos de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), es decir, cada día se diagnosticaron 32 nuevos casos, de los cuales 783 fueron fatales (1). Aunque el número de casos nuevos se ha mantenido en un rango estable en los últimos años, existe la percepción de que aún hay un subregistro muy importante. Además, una buena proporción de los casos se diagnosticó de forma tardía, con una alta frecuencia de pacientes en fases avanzadas, pues cerca del 93,2 % de los nuevos diagnósticos de infección por HIV se dio en pacientes que ya tenían el sida (1).

Las adenopatías son un hallazgo clínico frecuente en pacientes con esta infección, y el diagnóstico diferencial incluye infecciones, neoplasias malignas y cambios reactivos (2,3). Es de vital importancia diferenciar entre estas causas, pues el tratamiento, el pronóstico y los eventos adversos asociados pueden variar de manera significativa si hay un retraso en el diagnóstico. Sin embargo, la determinación de la etiología de la linfadenopatía constituye un reto importante para el clínico, quien debe decidir la pertinencia de la biopsia y su urgencia.

En varios estudios se ha descrito la etiología de las adenopatías en pacientes tratados con antirretrovirales y sin tratamiento. Los datos recopilados en ellos son diversos y, en su mayoría, provienen de series de casos de adenopatías en pacientes sometidos a biopsia por aspiración con aguja fina en zonas de gran prevalencia de tuberculosis, como lo es nuestro país (3-12). No existe información sobre la frecuencia o la etiología en los pacientes con adenopatías en Colombia. En el presente estudio retrospectivo se analizaron y describieron los resultados de las biopsias de ganglios linfáticos de pacientes en un hospital público de Medellín.

Materiales y métodos

Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Hospital La María de Medellín, reconocido a nivel regional como centro de referencia para la atención de pacientes con infección por HIV y tuberculosis multirresistente.

Correspondencia:
Jorge Alberto Cortés, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, Carrera 30 N° 45-03, oficina 510, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono:(571) 316 5000, extensión 15011
jacortesl@unal.edu.co

Recibido: 12/04/16; aceptado: 01/06/16

Se recopilaron los datos de las historias clínicas de pacientes sometidos a biopsia por escisión de ganglio linfático, durante el período comprendido entre enero de 2009 y diciembre de 2011. Los pacientes debían tener un diagnóstico confirmado de infección por HIV antes o durante el estudio de la adenopatía, según la definición del protocolo vigente para la época y mediante pruebas serológicas ratificadas con *Western blot*.

Recolección de la información y análisis estadístico

Los datos se recopilaron inicialmente de las bases de datos del Servicio de Cirugía y se referían a aquellos pacientes sometidos a biopsia por escisión de ganglio, tanto los hospitalizados como los atendidos ambulatoriamente. Solo se incluyeron pacientes mayores de quince años.

El protocolo de la institución para el estudio de las muestras de ganglio linfático de pacientes con HIV contempla los siguientes pasos: se toma una muestra destinada al cultivo de hongos, micobacterias y bacterias aerobias para el estudio microbiológico; se aplican las coloraciones de Ziehl-Neelsen (ZN), de auramina y rodamina, el examen directo y la tinción de Gram; otra muestra se envía al Laboratorio de Patología donde se hace la coloración con hematoxilina eosina. Con base en la historia clínica y los hallazgos con la coloración básica, el médico patólogo decide si es necesario complementar el estudio con tinciones especiales (ácido peryódico de Schiff, plata metenamina de Gomori, ZN modificado e inmunoperoxidasa, entre otras) e inmunohistoquímica.

Se recopilaron, asimismo, los datos demográficos, los síntomas del paciente en el momento del ingreso al hospital y el área de residencia según fuera urbana o rural. Se anotaron los conteos de carga viral y linfocitos T CD4, y si el paciente recibía el tratamiento antirretroviral altamente efectivo o no, aunque en caso de recibirlo no se registró su duración. Además, se registraron los resultados y el sitio anatómico de la biopsia de ganglio linfático (cervical, axilar, epitroclear, abdominal o inguinal) y el método de diagnóstico utilizado (directo y con tinciones, cultivo, histopatología). Dichos resultados se agruparon en tres categorías: etiología infecciosa, neoplásica o cambios reactivos. Los hallazgos reactivos benignos se agruparon sin diferenciar su categoría (hiperplasia folicular sin fragmentación, hiperplasia folicular con fragmentación, involución folicular y depleción folicular). Asimismo, se recopilaron los datos del diagnóstico final de los pacientes según

los hallazgos clínicos, microbiológicos, radiológicos e histológicos obtenidos durante el período de estudio de la adenopatía, y se registraron en una base de datos del programa Microsoft Office Excel®, versión 2010, para su análisis posterior. Los resultados se reportaron en valores absolutos y medidas de tendencia central. Se utilizó la prueba de ji al cuadrado para determinar las diferencias entre proporciones considerando significativas aquellas con un valor de p menor de 0,05. La prueba exacta de Fisher se utilizó cuando el número de casos era de cinco o menos.

Consideraciones éticas

El proyecto fue aprobado por el Comité Ético del Hospital La María de Medellín y de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Se garantizó la confidencialidad de la información y ningún registro contenía información sensible sobre la identidad de los pacientes. Dado que se trató de un estudio retrospectivo sin riesgo y no se registró información sobre la identidad de los participantes, no se solicitó consentimiento informado.

Resultados

En total, 120 pacientes con infección por HIV se sometieron a biopsia de ganglio linfático durante el período de estudio. En dos pacientes se hicieron dos biopsias con resultado similar, por lo cual en el análisis solo se incluyó el primer resultado.

La información demográfica y las características de los pacientes se resumen en el cuadro 1. La mayoría de los pacientes era de sexo masculino (79,2 %), con una edad media de 33,3 años (rango de 15 a 62 años), provenía del área urbana (82,5 %) y no estaba recibiendo tratamiento antirretroviral altamente efectivo (65,8 %).

La media del recuento de linfocitos T CD4 fue de 125,8 células por mm^3 (1 a 952 células/mm^3), pero, en trece pacientes no se disponía de esta información. De los 41 sujetos que recibían tratamiento antirretroviral altamente efectivo y cuya carga viral para HIV se había registrado, solo en tres (7,3 %) esta fue indetectable y en trece (31 %) no se registró el valor.

Cuadro 1. Características de los pacientes con infección por HIV y biopsia de ganglio (n=120)

Característica	n	%
Sexo masculino	95	79,2
Uso de antiretrovirales	41	34,2
Recuento de linfocitos CD4 (células/mm^3, media)	107	125,8 *
Procedencia		
Urbana	99	82,5
Rural	21	17,5

*: media

La frecuencia de los síntomas se presenta en el cuadro 2, así como los diagnósticos establecidos mediante la biopsia de ganglio. Los diagnósticos de las biopsias y su localización anatómica se resumen en el cuadro 3. Solo tres pacientes fueron completamente asintomáticos, pero presentaron adenopatías en el examen físico: uno con diagnóstico final de tuberculosis, uno con cambios reactivos y otro con síndrome de reconstitución inmunológica. El síntoma más común fue la fiebre (79,2 % de los pacientes).

Solo tres pacientes (2,5 %) tuvieron resultados normales en la biopsia de ganglio linfático; en el resto de biopsias, se detectó, por lo menos, una anormalidad con la siguiente distribución: en 58 % de los pacientes era de origen infeccioso, en 32,5 % respondía a cambios reactivos y en 6,6 % era de origen neoplásico. En 17 casos hubo más de un diagnóstico: ocho de origen infeccioso, ocho de cambios reactivos e infección, y uno de tuberculosis y síndrome de reconstitución inmunológica. No se encontraron más de dos diagnósticos simultáneos en ninguna de las biopsias. La mayoría de los pacientes con cambios reactivos tuvo fiebre y era menor de 40 años: el 36 % de los menores de 40 años y el 25,8 % de los mayores de esta edad presentaba estos cambios, aunque dicha diferencia no fue estadísticamente significativa.

Los diagnósticos basados en la biopsia de ganglio linfático según el recuento de linfocitos T CD4, se muestran en el cuadro 4. Se encontró una mayor frecuencia de pacientes con diagnóstico de algún tipo de infección en el grupo con linfocitos T CD4 en número menor de 50 células por mm^3. Según el área de residencia, se encontró que, en general, el recuento de linfocitos T CD4 fue similar entre pacientes del área urbana y del área rural (menos de 200 células/mm^3 en 77,7 % de los pacientes procedentes del área urbana *Vs*. 76,04 % del área rural), así como el uso del tratamiento antirretroviral altamente efectivo (35,4 % del área urbana *Vs*. 28,6 % del área rural). Sin embargo, hubo diferencias importantes en la frecuencia de ciertas infecciones, pues en el 28,5 % de los pacientes del área rural se encontró histoplasmosis ganglionar, mientras que esta solo se reportó en 9,1 % de aquellos del área urbana

Cuadro 2. Manifestaciones clínicas y diagnósticos a partir de la biopsia

Signos y síntomas	Diagnóstico a partir de la biopsia de ganglio						
	Tuberculosis (n=58) n %	Cambios reactivos (n=39) n %	Histoplasmosis (n=15) n %	Complejo *M. avium* (n=5) n %	Linfoma (n=5) n %	Criptococosis (n=3) n %	Otro (n=8) n %
Fiebre	51 (87,9)	30 (76,9)	12 (80,0)	3 (60,0)	3 (60,0)	3 (100)	5 (62,5)
Tos	36 (62,1)	22 (56,4)	6 (40,0)	0 (0)	3 (60,0)	0 (0)	4 (50)
Pérdida de peso	27 (46,6)	14 (35,9)	10 (66,7)	4 (80,0)	3 (60,0)	2 (66,7)	3 (37,5)
Disnea	17 (29,3)	6 (15,4)	2 (13,3)	1 (20,0)	0 (0)	0 (0)	2 (25)
Dolor abdominal	12 (20,7)	8 (20,5)	7 (46,7)	3 (60,0)	1 (20,0)	0 (0)	0 (0)
Diarrea	24 (41,4)	13 (33,3)	6 (40,0)	3 (60,0)	2 (40,0)	1 (33,3)	2 (25)
Cefalea	15 (25,9)	7 (17,9)	3 (20,0)	0 (0)	1 (20,0)	1 (33,3)	0 (0)
Lesiones de piel y mucosas	1 (1,7)	3 (7,7)	2 (13,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)

Cuadro 3. Tipo de diagnóstico final según la ubicación anatómica del ganglio estudiado

Diagnóstico	Localización anatómica					Total
	Cervical n %	Axilar n %	Epitroclear n %	Inguinal n %	Mesentérica n %	
Tuberculosis	47 (81,0)	6 (10,3)	1 (1,7)	1 (1,7)	3 (5,2)	58
Cambios reactivos	31 (79,5)	2 (5,1)	1 (2,6)	5 (12,8)	0 (0)	39
Histoplasmosis	12 (80,0)	0 (0)	0 (0)	3 (20,0)	0 (0)	15
Complejo *M. avium*	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5
Linfoma	3 (60,0)	1 (20,0)	0 (0)	0 (0)	1 (20,0)	5
Criptococosis	1 (33,3)	1 33,3)	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	3
Otros (*)	5 (62,5)	0 (0)	1 (12,5)	2 (25,0)	0 (0)	8

*Otros: sarcoma de Kaposi=2; síndrome de reconstitución inmunológica=2, linfadenopatía necrosante con absceso=1, microgranulomas inespecíficos=1, paracoccidioidomicosis=1, adenocarcinoma metastásico en sitio no identificado=1

Cuadro 4. Diagnóstico del ganglio según el conteo de CD4

Diagnóstico	Recuento de linfocitos T CD4 (%)			
	≤50 células/mm³	51-200 células/mm³	>200 células/mm³	Sin dato
Tuberculosis (n=58)	28 (48,3)	16 (27,6)	11 (18,9)	3 (5,2)
Cambios reactivos (n=39)	12 (30,8)	12 (30,8)	9 (23,7)	6 (15,4)
Histoplasmosis (n=15)	9 (60,0)	1 (6,7)	3 (20)	2 (13,3)
Complejo *M. avium* (n=5)	4 (80,0)	0 (0)	0 (0)	1 (20)
Linfoma (n=5)	2 (40,0)	1 (20,0)	1 (20)	1 (20,0)
Criptococosis (n=3)	2 (66,7)	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)

(p=0,025). Aunque los cambios reactivos fueron más comunes en los pacientes del área urbana (36,3 % *Vs*. 14,2 %), las diferencias no fueron estadísticamente significativas (p=0,07; prueba exacta de Fisher).

Por último, se encontró que nueve pacientes con tuberculosis ganglionar tenían infecciones oportunistas diferentes en otros órganos. De aquellos con tuberculosis diseminada, dos tuvieron diagnóstico de histoplasmosis ganglionar, uno, de criptococosis ganglionar, y otro, de metástasis ganglionares axilares contralaterales. Además, entre los pacientes con criptococosis en ganglio linfático, uno presentaba también tuberculosis diseminada y, otro, sarcoma de Kaposi diseminado. En ninguno de estos casos se encontró evidencia de tales condiciones en el ganglio examinado.

Entre los pacientes con histoplasmosis ganglionar se encontró un caso de infección diseminada por citomegalovirus y dos de neumonitis por

Pneumocystis jirovecii, sin que dichas condiciones se evidenciaran en los estudios de histopatología del ganglio. Ninguno de los pacientes con diagnóstico de linfoma mediante la biopsia ganglionar presentó otra condición adicional.

Discusión

Este trabajo constituye un aporte al conocimiento de la epidemiología de las infecciones oportunistas y los tumores en pacientes con infección por HIV en Colombia. La mayoría de los trabajos sobre adenopatías en estos pacientes se ha llevado a cabo en países donde la tuberculosis es endémica (India, Brasil, Irán, Zambia y Malasia) y donde, además, el número de pacientes con sida es alto y el acceso al tratamiento antirretroviral altamente efectivo es bajo, al igual que en nuestro país (3,5,6,13-19). A diferencia de estos estudios, en los cuales la mayoría de los ganglios estudiados se evaluaron mediante una biopsia por aspiración con aguja fina, todos los pacientes en este estudio se sometieron a biopsia por escisión de ganglio linfático.

En general, en la mayoría de ellos y en los de las series de casos citadas, las adenopatías respondieron a una causa infecciosa. Dadas las condiciones epidemiológicas mencionadas, era predecible que la infección más común fuera la tuberculosis (casi la mitad), lo cual coincide con los datos publicados en otras series, donde la frecuencia ha oscilado entre el 26 y el 67 % (3,6,13-19). En un estudio en Sudáfrica, Maartens, *et al.*, encontraron una frecuencia mucho mayor de tuberculosis (92 %) (5), diferencia que probablemente se deba a la mayor incidencia de esta enfermedad en ese país (860 casos por 100.000 habitantes, en comparación con 26 por cada 100.000 en Colombia) (20) y porque, además, en dicho estudio la población evaluada incluyó solo a pacientes con sospecha de tuberculosis y con baciloscopia de esputo negativa. Por el contrario, la frecuencia de la enfermedad según los estudios de Bogoch, *et al.* (12), y de Bottles, *et al.* (2), de 2,8 % y 10 %, respectivamente, se explicaría por la baja incidencia de la tuberculosis en Norteamérica, donde apenas alcanza los tres casos por 100.000 habitantes (21).

La histoplasmosis fue un hallazgo común, diagnosticada en 12,5 % de los casos. No obstante, este no es un hallazgo frecuente en otras series, pues en la mayoría no se ha descrito dicha infección (2,5,12,19,22,23) y solo en cuatro estudios se han registrado frecuencias de histoplasmosis ganglionar entre 0,6 % y 5,1 % (3,7,8,18). En el estudio de Cortez, *et al*., en Brasil (17), la frecuencia de histoplasmosis ganglionar fue de 8,7 %, resultado similar al del presente estudio.

Las diferencias encontradas responderían a varias razones: las distintas prevalencias de la enfermedad, los medios de diagnóstico utilizados (en todos los pacientes del presente estudio se hizo cultivo para hongos) y, además, la habilidad y conocimiento del personal para sospechar y detectar el microorganismo oportunista causante de la infección.

Este estudio se hizo en un hospital de referencia para pacientes con infección por HIV a nivel regional, con experiencia en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades infecciosas asociadas. Además, en Antioquia se ha documentado claramente la relación entre la infección por HIV y la histoplasmosis oportunista (24), y es el departamento del país con la mayor detección de casos, seguido por el Valle del Cauca y Cundinamarca (25).

La poca frecuencia de condiciones neoplásicas (linfoma, sarcoma de Kaposi, adenocarcinoma metastásico), a pesar del estado de inmunosupresión avanzado de la población estudiada (promedio de linfocitos T CD4 de 125,8 células/mm^3), podría explicarse, en parte, por la baja tasa de uso del tratamiento antirretroviral altamente efectivo, pues, aunque la mayoría de los pacientes estaba en estadios avanzados de la infección, su supervivencia no se había prolongado y, por lo tanto, no habían desarrollado la mayoría de los cánceres frecuentes en estos casos.

Una revisión sistemática en la cual se evaluó el impacto de este tipo de tratamiento en la evolución de los cánceres, reveló que este disminuyó la frecuencia de neoplasias definitorias y aumentó la de aquellos tumores no definitorios (26). La poca frecuencia del uso de este tratamiento se ha relacionado con lo encontrado para este tipo de linfomas y sarcomas, y con la poca frecuencia de adenocarcinomas. En este sentido, es necesario hacer estudios con otras poblaciones en el futuro, ya que es posible que con el tiempo cambie la proporción de los hallazgos que aquí se describen. La información recolectada en otras series de casos evidencia una frecuencia muy dispar, puesto que se registra enfermedad neoplásica entre 2,6 % y 42,9 % de los pacientes (3,8,12,17,22), con una notoria variación según la metodología utilizada y el tipo de estudio del ganglio linfático.

El hallazgo de cambios reactivos en este estudio se dio en 32,5 % de los pacientes, similar a lo descrito en otras series, en las cuales se han

registrado frecuencias entre 25 y el 50 %, con diferencias importantes en cuanto a la población estudiada, el acceso al tratamiento antirretroviral altamente efectivo y la inmunosupresión. Se detectaron cambios reactivos con mayor frecuencia en los menores de 40 años, lo cual diverge de lo encontrado en el estudio de Bogoch, *et al*. (12), en el que una edad de más de 40 años, el uso del tratamiento, la presencia de fiebre, la pérdida de peso y el tamaño de los ganglios estudiados se asociaron con el aumento de la probabilidad de cambios reactivos en los ganglios de pacientes con infección por HIV. Además, los hallazgos en los pacientes de este estudio fueron más frecuentes en aquellos que no seguían el tratamiento antirretroviral altamente efectivo y no habían experimentado pérdida de peso. No obstante, es necesario aclarar que la metodología empleada en este estudio fue muy diferente, pues la investigación citada fue prospectiva y el cálculo de la muestra se estableció para poder encontrar dichas diferencias, y además, la frecuencia de los cambios reactivos fue mayor (50 %).

Es importante mencionar que en 6,6 % de los pacientes se evidenció más de una infección en la biopsia de ganglio linfático y, además, 17 tuvieron una infección diferente a la encontrada en otros sitios. Es decir, la biopsia de ganglio linfático permitió diagnosticar una infección oportunista adicional en el 14,1 % de los pacientes estudiados.

Se encontraron diferencias en la frecuencia de histoplasmosis ganglionar entre los pacientes del área rural y aquellos provenientes de áreas urbanas; sin embargo, debido a la metodología empleada y al número de pacientes, no se pudo establecer una asociación clara.

El presente estudio tuvo varias limitaciones. La naturaleza retrospectiva de la metodología utilizada conllevó sesgos de selección y fallas en la recolección de la información que no dependieron de los investigadores, pues se debieron a la falta de datos. No se contó con información sobre el recuento de linfocitos T CD4 en 11 % de los pacientes y de la carga viral del HIV en 33,3 %, no se describió el tamaño de los ganglios ni de todas las cadenas comprometidas en un mismo paciente, y no se obtuvo información precisa sobre el tiempo de uso del tratamiento antirretroviral altamente efectivo. Además, como ya se ha explicado, el estudio se hizo en un centro de referencia para manejo de pacientes con infección por HIV, por lo que es posible que los resultados no puedan generalizarse a toda la población infectada.

En conclusión, la biopsia de ganglio linfático en pacientes con infección por HIV es una herramienta útil que permite el diagnóstico de enfermedades infecciosas graves y neoplásicas asociadas, por lo cual debería ser de uso rutinario en todos los pacientes con adenopatías, independientemente de su sintomatología, su estado de inmunosupresión o la presencia de infecciones o enfermedades localizadas en sitios diferentes a los ganglios.

El notable rendimiento diagnóstico de la biopsia de ganglios cervicales debe motivarnos para buscarlos en la exploración clínica y, por su fácil acceso quirúrgico, a solicitar su biopsia tan pronto sean detectados. De esta forma, el resultado de enfermedades con gran mortalidad, como la tuberculosis y la histoplasmosis, para las cuales existe un tratamiento eficaz, podría ser favorable en estos pacientes.

Agradecimientos

Al Hospital La María de Medellín; a Anita Montañez Ayala, por el apoyo administrativo, y a la doctora Lucía Correa, por el apoyo en el estudio de histopatología.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiación

El presente estudio no contó con financiación directa de ninguna institución.

Referencias

1. **Instituto Nacional de Salud.** VIH-sida y muerte por sida. Semana epidemiológica número 52 de 2015 (27 de diciembre - 2 de enero). Boletín Epidemiológico Semanal. 2015;52:48-9.
2. **Bottles K, McPhaul LW, Volberding P.** Fine-needle aspiration biopsy of patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): Experience in an outpatient clinic. Ann Intern Med. 1988;108:42-5. http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-108-1-42
3. **Kamana NK, Wanchu A, Sachdeva RK, Kalra N, Rajawanshi A.** Tuberculosis is the leading cause of lymphadenopathy in HIV-infected persons in India: Results of a fine-needle aspiration analysis. Scand J Infect Dis. 2010;42:827-30. http://dx.doi.org/10.3109/00365548.2010.498016
4. **Reid AJ, Miller RF, Kocjan GI.** Diagnostic utility of fine needle aspiration (FNA) cytology in HIV-infected patients with lymphadenopathy. Cytopathology. 1998;9:230-9. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2303.1998.00149.x
5. **Wilson D, Nachega JB, Chaisson RE, Maartens G.** Diagnostic yield of peripheral lymph node needle-core biopsies in HIV-infected adults with suspected smear-negative tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2005;9:220-2.

6. **Vanisri HR, Nandini NM, Sunila R.** Fine-needle aspiration cytology findings in human immunodeficiency virus lymphadenopathy. Indian J Pathol Microbiol. 2008;51:481-4.

7. **Sarma PK, Chowhan AK, Agrawal V, Agarwal V.** Fine needle aspiration cytology in HIV-related lymphadenopathy: Experience at a single centre in north India. Cytopathology. 2010;21:234-9. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2303.2009.00712.x

8. **Laishram RS, Devi RK, Khuraijam S, Devi KR, Khuraijam S, Sharma LD.** Fine needle aspiration cytology of HIV-related lymphadenopathy in Manipur. JIACM. 2014;15:111-5.

9. **Martin-Bates E, Tanner A, Suvarna SK, Glazer G, Coleman DV.** Use of fine needle aspiration cytology for investigating lymphadenopathy in HIV positive patients. J Clin Pathol. 1993;46:564-6.

10. **Bem C.** Human immunodeficiency virus-positive tuberculous lymphadenitis in Central Africa: Clinical presentation of 157 cases. Int J Tuberc Lung Dis. 1997;1:215-9.

11. **Lowe SM, Kocjan GI, Edwards SG, Miller RF.** Diagnostic yield of fine-needle aspiration cytology in HIV-infected patients with lymphadenopathy in the era of highly active antiretroviral therapy. Int J STD AIDS. 2008;19:553-6. http://dx.doi.org/10.1258/ijsa.2008.008074

12. **Bogoch, II, Andrews JR, Nagami EH, Rivera AM, Gandhi RT, Stone D.** Clinical predictors for the aetiology of peripheral lymphadenopathy in HIV-infected adults. HIV Med. 2013;14:182-6. http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-1293.2012.01035.x

13. **Nayak S, Mani R, Kavatkar AN, Puranik SC, Holla VV.** Fine-needle aspiration cytology in lymphadenopathy of HIV-positive patients. Diagn Cytopathol. 2003;29:146-8. http://dx.doi.org/10.1002/dc.10340

14. **Saikia UN, Dey P, Jindal B, Saikia B.** Fine needle aspiration cytology in lymphadenopathy of HIV-positive cases. Acta Cytol. 2001;45:589-92.

15. **Shenoy R, Kapadi SN, Pai KP, Kini H, Mallya S, Khadilkar UN, *et al*.** Fine needle aspiration diagnosis in HIV-related lymphadenopathy in Mangalore, India. Acta Cytol. 2002;46:35-9.

16. **Ramos CG, Goldani LZ.** Biopsy of peripheral lymph nodes: A useful tool to diagnose opportunistic diseases in HIV-infected patients. Trop Doct. 2011;41:26-7. http://dx.doi.org/10.1258/td.2010.100145

17. **Cortez MV, Oliveira CM, Monte RL, Araujo JR, Braga BB, Reis DZ, *et al*.** HIV-associated tuberculous lymphadenitis: The importance of polymerase chain reaction (PCR) as a complementary tool for the diagnosis of tuberculosis - a study of 104 patients. An Bras Dermatol. 2011;86:925-31. http://dx.doi.org/10.1590/S0365-059620110005000

18. **Jayaram G, Chew MT.** Fine needle aspiration cytology of lymph nodes in HIV-infected individuals. Acta Cytol. 2000;44:960-6.

19. **Patil PS, Bem C.** Wide needle aspiration cytology in the diagnosis of lymphadenopathy in Zambia. J Clin Pathol. 1993;46:806-9.

20. **World Health Organization.** Global Tuberculosis Report 2014. Geneva: WHO; 2014.

21. **Siroka A, Ponce NA, Lonnroth K.** Association between spending on social protection and tuberculosis burden: A global analysis. Lancet Infect Dis. 2016;16:473-9. http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00401-6

22. **Hadadi A, Jafari S, Jebeli ZH, Hamidian R.** Frequency and etiology of lymphadenopathy in Iranian HIV/AIDS patients. Asian Pac J Trop Biomed. 2014;4:S171-6. http://dx.doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1253

23. **Shobhana A, Guha SK, Mitra K, Dasgupta A, Neogi DK, Hazra SC.** People living with HIV infection / AIDS - a study on lymph node FNAC and CD4 count. Indian J Med Microbiol. 2002;20:99-101.

24. **Velásquez G, Rueda ZV, Vélez LA, Aguirre DC, Gómez-Árias RD.** Histoplasmosis en pacientes con SIDA. Un estudio de cohorte en Medellín, Colombia. Infectio. 2010;14:S99-106. http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70127-2

25. **Arango M, Castañeda E, Agudelo CI, De Bedout C, Agudelo CA, Tobón A, *et al*.** Histoplasmosis: Results of the Colombian national survey, 1992-2008. Biomédica. 2011;31:344-56. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v31i3.348

26. **Cobucci RN, Lima PH, de Souza PC, Costa VV, Cornetta Mda C, Fernandes JV, *et al*.** Assessing the impact of HAART on the incidence of defining and non-defining AIDS cancers among patients with HIV/AIDS: A systematic review. J Infect Public Health. 2015;8:1-10. http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2014.08.003

Biomédica 2017;37:86-95
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3112

ARTÍCULO ORIGINAL

Caracterización de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos de individuos positivos para HIV en Colombia, 2012

Claudia Castro, Alba Ricardo, Angie Zabaleta, Claudia Llerena, Gloria Puerto

Laboratorio de Micobacterias, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Una tercera parte de los casos nuevos de tuberculosis se atribuye a la propagación del HIV. En 2012, se presentaron en Colombia 1.397 casos de tuberculosis concomitante con la infección por HIV, es decir, 11,8 % del total de notificados. El uso de las herramientas de epidemiología molecular contribuye a una mejor comprensión de la transmisión de la enfermedad.
Objetivo. Caracterizar los aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* de individuos positivos para HIV recibidos en el Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Nacional de Salud.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio observacional descriptivo. Se estudiaron 63 aislamientos de individuos con tuberculosis e infección por HIV mediante pruebas de identificación, sensibilidad y genotipificación.
Resultados. Dos de los casos nuevos (3,3 %) eran resistentes a rifampicina y uno (1,6 %) a isoniacida, en tanto que tres (5,0 %) lo eran a la isoniacida combinada con estreptomicina. Los casos previamente tratados fueron sensibles. No se evidenció multirresistencia. Hubo 20 (31,7 %) aislamientos de la familia genética LAM9, 8 (12,7 %) de la H1 y 7 (11,1 %) de la T1 . Diecinueve aislamientos correspondieron a patrones huérfanos. Se observó un único agrupamiento entre los aislamientos analizados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la resistencia a fármacos y las familias genéticas.
Conclusión. La resistencia encontrada demostró la transmisión de cepas resistentes a rifampicina e isoniacida. Las familias genéticas LAM9, T1 y H1 corresponden a las descritas en la población general. No se evidenció transmisión activa en los aislamientos estudiados. Se necesitan estudios más completos para conocer la situación real de la infección concomitante de tuberculosis y HIV en el país.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*/transmisión; HIV; coinfección; epidemiología molecular; resistencia a medicamentos.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3112

Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from HIV positive individuals in Colombia, 2012

Introduction: One third of the increase in tuberculosis cases is attributed to the spread of HIV. In 2012, 1,397 HIV-associated tuberculosis cases were reported in Colombia, i.e., 11.8% of the total cases. Molecular epidemiology tools help to understand the transmission of tuberculosis.
Objective: To characterize clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* derived from HIV-infected individuals, received at the *Laboratorio Nacional de Referencia* in the *Instituto Nacional de Salud*.
Materials and methods: This was a descriptive observational study. We analyzed 63 isolates of *M. tuberculosis* from HIV-infected individuals. Identification, drug susceptibility and genotyping assays were performed.
Results: Of the new cases evaluated, three (5.0%) were resistant to isoniazid combined with streptomycin; two (3.3%) to rifampicin, and one (1.6%) to isoniazid. Previously treated cases were sensitive. No multidrug resistance was evident. Among the predominant genotypes, 20 isolates were (31.7%) LAM9, eight (12.7%), H1, and seven (11.1%), T1. Nineteen isolates corresponded to orphan patterns. One single grouping was observed among tested isolates. We found no statistically significant difference between the proportions of the antituberculous drug resistance and genotypes.

Contribución de los autores:
Gloria Puerto, Claudia Llerena y Claudia Castro: concepción y diseño de los experimentos
Alba Ricardo, Angie Zabaleta y Claudia Castro: desarrollo de los experimentos
Angie Zabaleta y Claudia Castro: análisis de los datos
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

Conclusion: We found resistant isolates to the most powerful drugs, rifampicin and isoniazid, among new cases, showing the transmission of resistant strains. Genetic families of *M. tuberculosis* LAM9, T1 and H1 correspond to those described in the general population. We detected no active transmission among studied isolates. More comprehensive studies are needed to assess the real situation of HIV-associated tuberculosis in the country regarding sensitivity and transmission.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*/transmission; HIV; coinfection; molecular epidemiology; drug resistance.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3112

La tuberculosis es un problema de salud pública a nivel mundial. Durante el 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó 8,6 millones de casos a nivel mundial, y 1,3 millones de muertes por esta causa (1). Muchos factores se han asociado durante la última década al incremento en el número de casos de la enfermedad, una tercera parte del cual se atribuye a la propagación del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (2). Durante ese año, en el mundo se presentaron 1,1 millones de casos de infección concomitante de tuberculosis y HIV, de los cuales 31.000 se registraron en Latinoamérica.

En el 2012, se diagnosticaron en Colombia 11.990 casos de pacientes con tuberculosis en todas las formas, de los cuales 7.572 (63,2 %) habían solicitado la prueba voluntaria para HIV, y 1.397 (11,8 %) presentaban infección concomitante de tuberculosis y HIV (3).

Desde 2009, el Programa Nacional de Control de Tuberculosis definió los grupos de riesgo de tuberculosis mediante la circular 058, entre ellos, los casos de personas con HIV, cuyo diagnóstico se debe hacer por baciloscopia, cultivo y prueba de sensibilidad a fármacos antituberculosos (4). En el Grupo de Micobacterias de la Dirección de Redes en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud, se reciben los cultivos de casos de tuberculosis provenientes de algunos de los entes territoriales, con el fin de hacer las pruebas de sensibilidad en el marco de las actividades de vigilancia en salud pública.

Además, en el Grupo de Micobacterias, se hacen estudios de epidemiología molecular para conocer la cadena de transmisión de la enfermedad, establecer las causas de las recurrencias y proveer información para determinar la transmisión activa, evidenciada por la circulación de genotipos y la presencia de agrupamientos, información que contribuye al control de la enfermedad en diferentes poblaciones, especialmente en los grupos de riesgo, como es el caso de pacientes con infección concomitante de tuberculosis y HIV (5-8). En los países en donde la tuberculosis y la infección por HIV son endémicas, es común encontrar casos agrupados en los análisis de epidemiología molecular, lo cual demuestra la expansión epidémica de la tuberculosis asociada al HIV (6,9-10).

Por lo tanto, es importante el desarrollo de estudios que analicen la repercusión de la infección por el HIV en la transmisión y la adquisición de la resistencia a los medicamentos, como parte de las prioridades en investigación cuando los recursos son limitados y dicha infección es prevalente (11). En este contexto, los análisis de transmisión mediante estudios de epidemiologia molecular y la vigilancia de la resistencia a los fármacos deben hacerse rutinariamente en este grupo de pacientes.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* de individuos positivos para el HIV, recibidos en el Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud durante el primer semestre de 2012.

Materiales y métodos

Tipo de estudio

Se hizo un estudio observacional y descriptivo para caracterizar los aislamientos de casos con infección concomitante de tuberculosis e infección por HIV en Colombia, recibidos en el primer semestre de 2012. En el análisis se tuvieron en cuenta las variables sociodemográficas relacionadas con el paciente, los perfiles de resistencia a fármacos antituberculosos y la genotipificación de los aislamientos.

Aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis*

Se analizaron 63 aislamientos provenientes de individuos con tuberculosis e infección por HIV, registrados en el formato único de vigilancia de

Correspondencia:
Claudia Marcela Castro, Laboratorio de Micobacterias, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 220 7700, extensión 1244 o 1246
ccastro@ins.gov.co

Recibido: 27/10/15; aceptado: 09/06/16

micobacterias en la categoría de “persona que convive con el HIV”, y con resultado en la prueba de sensibilidad a los fármacos antituberculosos. Dichos registros fueron remitidos al Instituto Nacional de Salud por los laboratorios de salud pública de aquellos entes territoriales que no cuentan con estas pruebas.

Pruebas de laboratorio

Identificación de especie y sensibilidad. Los aislamientos se sometieron a identificación fenotípica, mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas que detectan el complejo *M. tuberculosis* (12). Para determinar los patrones de sensibilidad, se utilizó la técnica semiautomatizada en medio líquido Bactec MGIT™, en la cual se emplea un tubo que contiene caldo Middlebrook 7H9 y un compuesto de rutenio fluorescente incluido en silicona, y se fundamenta en la acción de consumo de oxígeno por parte de la micobacteria, lo cual libera la fluorescencia del compuesto y permite detectar su viabilidad al ser expuesta a los fármacos para determinar si es sensible o resistente. Las concentraciones críticas usadas fueron las siguientes: estreptomicina, 1 y 4 µg/ml; isoniacida, 0,1 y 0,4 µg/ml; rifampicina, 1 µg/ml, y etambutol, 1 y 7,5 µg/ml. En la interpretación de los resultados se utilizó el programa Epicenter (13,14).

La calidad de las pruebas de sensibilidad a los fármacos fue evaluada por el Instituto de Salud Pública de Chile, el cual lleva a cabo un control anual a los laboratorios nacionales en el marco del programa mundial de vigilancia de la resistencia.

Tipificación mediante spoligotyping y Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number (MIRU-VNTR)

La extracción de ADN y la aplicación de la metodología de *spoligotyping* se hicieron según lo expuesto por Kamerbeek, *et al.,* en 1997. La tipificación con oligonucleótidos espaciadores (*spoligotyping*) es una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), útil para la discriminación de especies del complejo *M. tuberculosis* mediante la detección de espaciadores entre las repeticiones directas del locus DR (15). La metodología de MIRU-VNTR de 24 loci se hizo de forma manual mediante la amplificación por PCR de los 24 minisatélites y la visualización de los amplificados en geles de agarosa, según el protocolo descrito por Supply, *et al.,* en 2006 (16). Desde 2013, el Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Nacional de Salud garantiza la calidad de las pruebas de MIRU-VNTR mediante el control de calidad del Laboratorio de Referencia para Tuberculosis del Ministerio de Salud, Bienestar y Deportes de Holanda.

Análisis de agrupamientos

El agrupamiento se definió como dos o más aislamientos de *M. tuberculosis* con un patrón idéntico determinado mediante *spoligotyping* y MIRU.

Análisis molecular y designación de familias genéticas

Los patrones obtenidos por *spoligotyping* se compararon con la base de datos internacional SITVIT del Instituto Pasteur de Guadalupe (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE), y se designaron las familias genéticas y los códigos SIT (*Spoligo International Type*) (17).

La comparación de los resultados obtenidos mediante las dos metodologías, así como la generación de los dendrogramas y los árboles de expansión mínima (*Minimum Spanning Tree*, MST), se hicieron con el programa VNTR Plus. Para la construcción de los árboles MST, se usó el algoritmo *neighbor-joining* (18).

Los patrones de *spoligotyping* que no se encontraron en la base de datos SITVIT (patrones huérfanos), se analizaron mediante la herramienta *SpotClust* (http://tbinsight.cs.rpi.edu/run_spotclust.html SPOTCLUST), la cual hace una predicción de las familias genéticas de *M. tuberculosis* mediante el uso de un modelo derivado de la base de datos SpolDB3, con base en el análisis de los algoritmos de evolución de los patrones de *spoligotyping* (19).

Análisis de los datos

Se utilizaron tres fuentes de información. La primera correspondió al formato único de vigilancia de las micobacterias, documento establecido por el Instituto Nacional de Salud para el procesamiento de las pruebas de sensibilidad, el cual se recibe con cada cultivo y contiene información sobre el sexo y la edad de los pacientes, la forma clínica de la enfermedad, el ente territorial remitente y la condición de ingreso al programa de cada paciente (nuevo o previamente tratado), datos que deben ser recopilados por el personal de salud en la institución donde se los atiende. La segunda fueron los resultados de las pruebas de sensibilidad para la detección de los patrones de resistencia a los fármacos, y la tercera, la base de datos de los resultados de la genotipificación específica para este estudio.

Se describieron las variables sociodemográficas de los casos y su distribución geográfica empleando el programa EPI Info™, versión 7.1.3.

Se calculó la proporción de resistencia a fármacos, teniendo en cuenta la condición de ingreso de la persona al programa de tuberculosis (nuevo o previamente tratado), y los porcentajes de aislamientos sensibles y resistentes en cada una de las familias genéticas identificadas, con un intervalo de confianza de 95 %. Las diferencias entre las proporciones de resistencia a fármacos según familias genéticas se establecieron mediante la prueba exacta de Fisher, tomando como referencia la familia genética de *M. tuberculosis* con mayor número de aislamientos resistentes en el estudio, con un intervalo de confianza de 95 %, y una significación estadística de $p<0,05$.

Resultados

El análisis de las variables sociodemográficas evidenció que 37 (58,7 %) casos correspondían a pacientes de sexo masculino; el rango de edad osciló entre 19 y 59 años, con una mediana de 32. En 51 (80,9 %) casos se presentaron formas pulmonares y en 60 (95,2 %) la condición de ingreso al programa correspondió a pacientes nuevos, es decir, sin antecedente de tratamiento antituberculoso. Los casos analizados provenían de diez entes territoriales, principalmente del departamento del Valle del Cauca, con 24 (38,1 %) y Bogotá, con 13 (20,6 %) (cuadro 1).

Todos los aislamientos de los casos en estudio pertenecían al complejo *M. tuberculosis*, según las pruebas fenotípicas utilizadas. Al evaluar los patrones de resistencia en los 60 aislamientos provenientes de casos nuevos, se encontró que 54 (90 %) eran sensibles, dos (3,3 %) presentaron resistencia solo a la rifampicina, uno (1,6 %), resistencia a isoniacida, y tres (5 %), resistencia combinada a la estreptomicina y la isoniacida. La resistencia global para este grupo fue de 10 %. Los tres aislamientos (4,7 %) de casos previamente tratados fueron sensibles.

Los aislamientos de los 63 casos pertenecían a 11 familias genéticas de *M. tuberculosis* (cuadro 2). Diecinueve (30,1 %) de los resultados obtenidos por *spoligotyping* no mostraron similitud con los patrones de la base de datos SITVIT, y se consideraron patrones huérfanos. Entre las familias descritas en la base de datos mundial, se encontraron la LAM9, la H1 y la T1, con una frecuencia de 20 (31,7 %), ocho (12,7 %) y siete (11,1 %) casos, respectivamente. Los códigos SIT más frecuentes fueron el 42 (LAM9), el 53 (T1) y el 62 (H1).

Mediante el uso de *SpotClust* para la predicción de las familias genéticas de *M. tuberculosis*, los 19 casos huérfanos se clasificaron como sigue: ocho pertenecían a la familia H1, cinco, a LAM9, y dos aislamientos, a cada una de las familias T1, S y LAM2 (cuadro 3). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones de resistencia a los fármacos entre las familias genéticas de *M. tuberculosis* encontradas al tomar como referencia el patrón huérfano (cuadro 2). El análisis de los aislamientos por *spoligotyping* y MIRU-VNTR en el MST evidenció una gran prevalencia de la familia LAM (figura 1).

Al analizar los aislamientos con *spoligotyping* y MIRU-VNTR, solo se halló el agrupamiento de dos de ellos correspondientes a pacientes de Bogotá y Bucaramanga; uno de dichos pacientes tenía tuberculosis pulmonar y, el otro, tuberculosis extrapulmonar, y no fue posible establecer ningún vínculo epidemiológico entre ellos (figura 2).

Discusión

El análisis de los datos demográficos de sexo, edad y tipo de tuberculosis de los pacientes incluidos en el estudio arrojó proporciones similares a lo reportado por el Sivigila en el mismo año (3), a pesar de que el número de casos analizados en este trabajo fue mucho menor al de la notificación.

Los entes territoriales que más casos aportaron según la notificación del Sivigila fueron Antioquia, Valle del Cauca y Bogotá, con 44,3 %, en tanto que en este trabajo el mayor número de casos provenía del Valle del Cauca y Bogotá; no obstante, debe señalarse que la información de Antioquia no se analizó porque en este departamento se cuenta

Cuadro 1. Procedencia de los 63 casos de infección concomitante de tuberculosis y HIV incluidos en el estudio

Ente territorial	Número de casos	%
Bogotá, D.C.	13	20,63
Caldas	1	1,59
Cundinamarca	3	4,76
La Guajira	1	1,59
Meta	2	3,17
Norte de Santander	2	3,17
Quindío	3	4,76
Risaralda	7	11,11
Santander	7	11,11
Valle del Cauca	24	38,10
Total	63	100

Cuadro 2. Frecuencia de las familias de complejo *M. tuberculosis* encontradas en 63 aislamientos de personas con infección concomitante de tuberculosis y HIV, y análisis de las diferencias entre las proporciones de resistencia a fármacos según familias genéticas

Familia	Aislamientos (n=63)	%	$IC_{95\%}$	Resistente (n=6)		Sensible (n=58)		p*
				n	%	n	%	
LAM9	20	31,75	19,46-44,03	1	5,00	19	95,00	0,28
Huérfano	19	30,16	18,03-42,28	3	15,79	16	84,21	ref
H1	8	12,70	3,68-21,71	1	12,50	7	87,50	0,66
T1	7	11,11	2,56-19,66	0	0	7	100	0,37
LAM5	2	3,17	0,39-11,00	0	0	2	100	0,72
LAM5-LAM6	2	3,17	0,39-11,00	0	0	2	100	0,72
H3	1	1,59	0,04- 8,53	0	0	1	100	0,85
LAM2	1	1,59	0,04- 8,53	0	0	1	100	0,85
LAM3	1	1,59	0,04- 8,53	0	0	1	100	0,85
U(LAM3)	1	1,59	0,04- 8,53	1	100	0	0	0,20
X3	1	1,59	0,04- 8,53	0	0	1	100	0,85

*Prueba exacta de Fisher

Cuadro 3. Resultados del análisis de los 19 patrones huérfanos de aislamientos de *M. tuberculosis* procedentes de pacientes con infección concomitante de tuberculosis y HIV mediante la herramienta *SpotClust*

Código	Espoligotipos	Familia	Probabilidad
175	777771074000420	H1	0,999
403	777767774020631	H1	0,999
107	777767607760671	LAM9	0,999
365	777767605760771	LAM9	0,999
348	777747634000621	H1	0,999
368	777747634000621	H1	0,999
366	777367630740671	T1	0,999
457	777347676760660	T1	0,999
383	777347607740671	LAM9	0,999
315	757737607760771	LAM9	0,999
30	557247434000621	H1	0,999
179	517247606740661	LAM9	0,999
326	777777776020731	H1	0,992
590	777777776020731	H1	0,992
580	777737776020731	H1	0,992
280	677737607760631	LAM2	0,817
333	677737605760771	LAM2	0,817
311	776377777740731	S	0,810
596	776377777740731	S	0,810

con un laboratorio de salud pública que lleva a cabo la vigilancia de la resistencia y no envía datos al Instituto Nacional de Salud (3).

Son varias las razones por las cuales se documenta la presencia de resistencia en personas con HIV; se ha demostrado su mayor riesgo de desarrollar enfermedades de tipo gastrointestinal que reducen los niveles séricos de la rifampicina; asimismo, en individuos con acetilación rápida, la concentración de isoniacida, etambutol y pirazinamida es variable. Estos factores contribuyen a generar resistencia y están presentes en alrededor de 5,0 % de los casos de infección concomitante de tuberculosis y HIV (20). En este trabajo la resistencia global en los casos nuevos fue de 10 %, principalmente a rifampicina e isoniacida, es decir, a los dos medicamentos más eficaces en el esquema de tratamiento de la tuberculosis. En el grupo de los pacientes previamente tratados no se evidenció resistencia, lo que puede deberse al número de cultivos analizados.

En un estudio en un hospital de tercer nivel de atención en Camboya, se evaluó la sensibilidad a los fármacos antituberculosos en 236 personas con infección concomitante de tuberculosis y HIV, y se encontró una resistencia global en casos nuevos y previamente tratados de 29,4 % y 63,2 %, respectivamente. En los casos nuevos la resistencia a isoniacida fue de 13,9 % y a la rifampicina fue de 1,6 %, con una multirresistencia de 3,7 %. En los pacientes previamente tratados, la resistencia a la isoniacida y la rifampicina fue la misma (7,9 %), y se presentó multirresistencia en 28,9 % de los casos. Las diferencias entre los resultados obtenidos podrían deberse al comportamiento epidemiológico de la enfermedad en ambos países y a las diferencias en el tamaño de la muestra en cada uno de los trabajos (21).

En España, en una cohorte de pacientes con HIV, se encontró que el 5 % de los pacientes había desarrollado tuberculosis; a 175 se les hizo prueba de sensibilidad y se detectó una resistencia global en pacientes nuevos y previamente tratados de 11,1 % y 36,4 %, respectivamente. En los casos nuevos, la resistencia a isoniacida fue de 5,9 % y a rifampicina fue de 1,5 %, y hubo un caso de tuberculosis multirresistente. En pacientes previamente

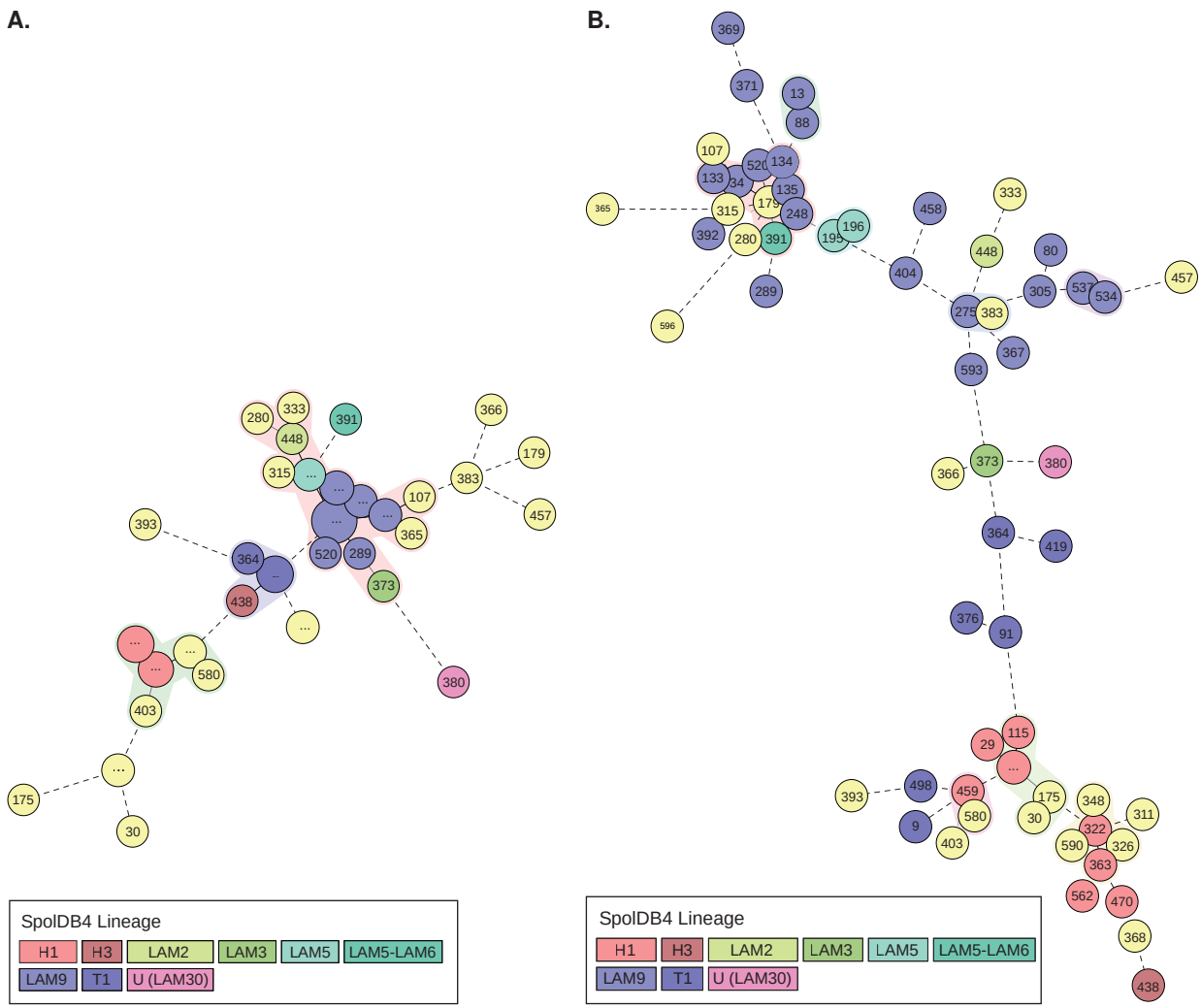


Figura 1. Árbol de expansión mínima (*Minimum Spanning Tree*, MST) que ilustra la relación entre los 63 genotipos identificados en aislamientos de pacientes con infección concomitante de tuberculosis y HIV. El MST ilustra la relación entre los 63 genotipos identificados en el estudio. **A.** Árbol construido con *spoligotyping.* **B.** Árbol construido con MIRU-VNTR. El árbol filogenético conecta cada genotipo con base en los cambios necesarios para ir de un alelo a otro. La longitud entre las ramas representa la distancia entre los genotipos, y el color diferencia las familias genéticas de *M. tuberculosis* descritas. Los genotipos sin código representan los patrones huérfanos.

tratados, la resistencia a isoniacida fue de 27,3 % y a rifampicina fue de 9,1 %, y se presentó un caso multirresistente. Los datos correspondientes a pacientes nuevos son similares a los del presente trabajo, y en los previamente tratados las diferencias se explicarían por el número de casos evaluado en cada estudio (22).

En un estudio en Perú para establecer la resistencia a los medicamentos antituberculosos en 523 personas con tuberculosis e infección por el HIV, se encontró una resistencia global de 55,8 % y 93 %, y una multirresistencia de 32,1 % y 74,8 % en casos nuevos y previamente tratados, respectivamente. En ese país se ha registrado una alta prevalencia de la resistencia a fármacos, razón por la cual no hay similitud entre los datos reportados en ese estudio y el presente (23).

En dos estudios en personas con tuberculosis e infección por el HIV en Colombia, se evaluó la sensibilidad a los fármacos teniendo en cuenta el antecedente de tratamiento. Uno de dichos estudios se hizo en el Valle del Cauca en 25 pacientes, y en él se encontró resistencia a isoniacida en 28,5 % de los casos nuevos, en tanto que no se encontró resistencia a la rifampicina ni multirresistencia; en pacientes previamente tratados, se detectó

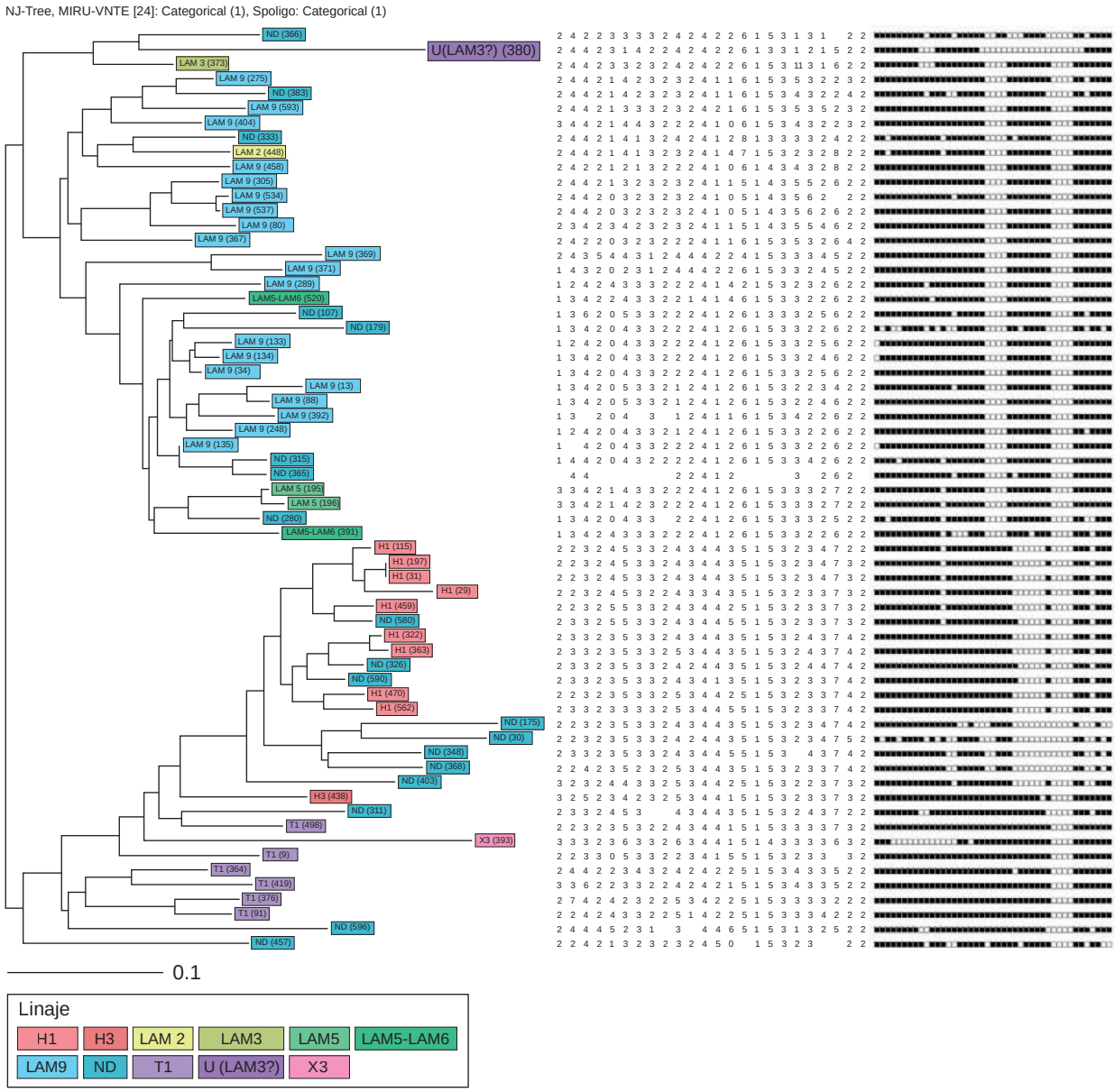


Figura 2. Dendrograma de los agrupamientos de los 63 aislamientos de pacientes con infección concomitante de tuberculosis y HIV obtenido mediante las metodologías de *spoligotyping* y MIRU-VNTR. Se observa un agrupamiento correspondiente a dos pacientes de Bogotá y Bucaramanga con idéntico genotipo, uno con tuberculosis pulmonar y el otro con tuberculosis extrapulmonar.

resistencia a la isoniacida (50 %) y a la rifampicina (25 %). En ese trabajo se analizó el 37 % de los casos de infección concomitante de tuberculosis y HIV que se presentaron a lo largo de cuatro años en una institución de tercer nivel de atención, por lo cual es posible que la mayoría provinieran de zonas con alta prevalencia de resistencia, como Cali y Buenaventura; además, el número de muestras analizadas fue inferior, razón por la cual los porcentajes de resistencia evidenciados fueron superiores a los informados en el presente trabajo (24).

El segundo estudio se hizo en Medellín, en 22 personas positivas para HIV, en las cuales la resistencia global fue de 18,2 %; se detectó resistencia a rifampicina en un paciente y multirresistencia en otro (4,5 %), ambos correspondientes a casos nuevos. Medellín es uno de los municipios con altas tasas de tuberculosis resistente, por lo cual los porcentajes obtenidos en ese estudio fueron superiores a los de este, en el cual, como ya se mencionó, no se incluyeron aislamientos de Antioquia (25).

Las familias genéticas encontradas correspondieron a las de mayor prevalencia en casos de tuberculosis en la población general del país (26-28). Además, se trata de familias genéticas de *M. tuberculosis* prevalentes en los demás países de Latinoamérica, con frecuencias muy similares a las reportadas en Perú, Argentina y, recientemente, Honduras (29-31). Puerto, *et al.,* describieron las familias genéticas prevalentes en 741 aislamientos de *M. tuberculosis* circulantes en Colombia entre 1999 y 2012, y al igual que en este estudio, las familias LAM9, los genotipos huérfanos, y las familias H1 y T1 presentaron las más altas frecuencias, con 27, 17, 11,9 y 6,9 %, respectivamente (27). Asimismo, Realpe, *et al*., en Medellín, Cali y poblaciones del Cauca, y Cerezo, *et al*., en Bogotá, encontraron que las familias genéticas de *M. tuberculosis* más frecuentes correspondían a LAM9, H1 y T1 (más del 70 % de las familias encontradas) (26,28); sin embargo, a diferencia de los resultados de Puerto, *et al*., y los obtenidos en este estudio, el número de patrones huérfanos apenas representó un porcentaje de 4,8 y 3,9, respectivamente.

La identificación de aislamientos con patrones huérfanos utilizando *SpotClust* evidenció su pertenencia a las familias de *M. tuberculosis* descritas como prevalentes en Colombia.

En el país se han hecho varios estudios de caracterización molecular de casos de tuberculosis, en los que se ha evidenciado la asociación de la infección concomitante de tuberculosis y HIV con la transmisión reciente y los patrones agrupados (32), así como una asociación significativa entre aislamientos y familias genéticas específicas (26). En este estudio no se observó una asociación entre los aislamientos o las familias genéticas descritas, probablemente debido a que los aislamientos provenían de varios departamentos del país, lo cual refleja un panorama general de la circulación de genotipos y no de la transmisión confinada a una sola región. La observación de patrones únicos no agrupados puede deberse a la reactivación de infecciones latentes, o, según los hallazgos de estudios similares sobre pacientes con tuberculosis con HIV en regiones de alta incidencia, corresponderían a infecciones recientes adquiridas después de la infección por HIV (5,33).

En el estudio de Realpe, *et al*., en el cual se genotipificaron siete aislamientos de pacientes con tuberculosis e infección por HIV, se encontró que las familias H1, código SIT 727, y T1, código SIT 53, tenían una mayor prevalencia, y en los 407 aislamientos de pacientes negativos para el HIV se encontró una asociación significativa del SIT 45, perteneciente a la familia H1, con multirresistencia (26). En este estudio no se encontró relación significativa entre los genotipos y la presencia de resistencia a los fármacos.

En China, Liu, *et al.*, analizaron 70 aislamientos de personas con HIV y establecieron que los genotipos de *M. tuberculosis* circulantes en la población en general eran los mismos que en personas con tuberculosis e infección por HIV; además, encontraron una tasa de prevalencia de casos de tuberculosis extremadamente resistente mayor en estos individuos que en la población general (33).

Los casos analizados se recibieron en el Instituto Nacional de Salud durante un periodo de seis meses, y no se consideró la información sobre la notificación de casos de infección concomitante de tuberculosis y HIV en ese mismo periodo; sin embargo, al revisar todos los casos con infección concomitante en el 2012, se encontró que los 63 analizados correspondían a 4,5 % del total (63/1.397). Este bajo porcentaje se debe a que Antioquia y Atlántico tienen la capacidad de hacer las pruebas de sensibilidad a fármacos y no envían los aislamientos al Instituto; por otra parte, ante la baja carga bacilar de las muestras procedentes de pacientes con infección concomitante de tuberculosis y HIV, no siempre se logra la comprobación bacteriológica y el diagnóstico se hace con base en el criterio clínico o por nexo epidemiológico. Algunos estudios indican que el porcentaje de casos de tuberculosis en personas con HIV que acceden a un diagnóstico por pruebas de laboratorio es de 65 % (22). Otra de las causas podría ser que, a pesar de contar con un lineamiento nacional, el médico tratante no solicita las pruebas de sensibilidad, lo cual evidencia debilidades en la vigilancia de la resistencia en este grupo de pacientes. Las razones mencionadas fueron limitaciones del estudio, por lo tanto, no se puede excluir la posibilidad de transmisión activa en estos pacientes.

La selección de los casos también representó una limitación, ya que la fuente primaria de información fueron los formatos únicos que se emplean para remitir los cultivos al Laboratorio Nacional de Referencia, en los cuales se indica que la muestra proviene de un paciente con HIV, y es posible que durante el periodo de estudio llegaran más cultivos de personas con esta condición, pero, al no estar registradas en este formato, no fueron incluidos en el trabajo.

Los resultados de este estudio evidencian la necesidad de fortalecer las actividades de vigilancia de la tuberculosis en personas con HIV. Se requieren estudios más completos que permitan evaluar una proporción representativa de aislamientos durante un mayor periodo, con la participación de otros grupos de investigación del país y con una supervisión de los datos registrados en los formatos únicos, lo cual permitiría conocer la situación real de la dinámica de transmisión de la tuberculosis en pacientes con HIV en el país para, así, proponer estrategias de intervención a los programas nacionales de tuberculosis y de HIV.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existen conflictos de intereses.

Financiación

Este proyecto fue financiado por el Instituto Nacional de Salud de Colombia.

Referencias

1. **World Health Organization.** Global tuberculosis control: WHO report 2013. Geneva: WHO; 2013.
2. **Organización Panamericana de la Salud.** Coinfección TB-HIV. Guía clínica. Washington, D.C.: OPS; 2008.
3. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del evento tuberculosis hasta el periodo epidemiológico 13 del año 2012. Fecha de consulta: 28 de julio de 2014. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiolgico/TUBERCULOSIS%202012.pdf.
4. **Ministerio de la Protección Social.** Circular externa 058 de 2009. Lineamientos para el manejo programático de tuberculosis y lepra en Colombia. Bogotá, D.C.: Ministerio de la Protección Social; 2009.
5. **Fenner L, Egger M, Bodmer T, Furrer H, Ballif M, Battegay M, *et al*.** HIV infection disrupts the sympatric host–pathogen relationship in human tuberculosis. PLoS Genet. 2013;9:e1003318. http//dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003318
6. **Adams LV, Kreiswirth B, Albert R, Soini H, Mtel L, Matee M, *et al*.** Molecular epidemiology of HIV-associated tuberculosis in Dar es Salaam, Tanzania: Strain predominance, clustering and polyclonal disease. J Clin Microbiol. 2013;50:2645-50. http//dx.doi.org/10.1128/JCM.00624-12
7. **Úriz J, Repáraz J, Castiello J, Sola J.** Tuberculosis en pacientes infectados por el VIH. An Sist Sanit Navar. 2007;30(Suppl.2):S131-42.
8. **Bruchfeld J, Correia-Neves M, Källenius G.** Tuberculosis and HIV coinfection. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015; 5:a017871. http//dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a017871
9. **Houben RM, Glynn JR, Mallard K, Sichali L, Malema S, Fine PE, *et al*.** Human immunodeficiency virus increases the risk of tuberculosis due to recent re-infection in individuals with latent infection. Int J Tuberc Lung Dis. 2010;14:909-15.
10. **Middelkoop K, Mathema B, Myer L, Shashkina E, Whitelaw A, Gilla Kaplan G, *et al*.** Transmission of tuberculosis in a South African community with a high prevalence of HIV infection. J Infect Dis. 2015;211:53-61. http//dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu403
11. **Organización Mundial de la Salud.** Cuestiones prioritarias en materia de investigación sobre la tuberculosis y la infección por el VIH en entornos de recursos limitados donde la infección por el VIH es prevalente. Ginebra: OMS; 2011.
12. **Instituto Nacional de Salud.** Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis y micobacteriosis. Bogotá, D.C.: INS; 2012.
13. **Becton Dickinson.** Manual técnico de MGIT 960® para evaluación de resistencia a fármacos antituberculosos. Heidelberg: Becton Dickinson; 2009.
14. **Springer B, Lucke K, Calligaris-Maibach R, Ritter C, Böttger E.** Quantitative drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by use of MGIT 960 and EpiCenter instrumentation. J Clin Microbiol. 2009;47:1773-1780. http//dx.doi.org/10.1128/JCM.02501-08
15. **Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, *et al*.** Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol. 1997;35: 907-14.
16. **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
17. **Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, *et al*.** SITVITWEB - A publicly available international multi-marker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. Infect Genet Evol. 2012;12:755-66. http//dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.02.004
18. **Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S.** Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTR*plus*, 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
19. **Vitol I, Driscoll J, Kreiswirth B, Kurepina N, Bennett KP.** Identifying *Mycobacterium tuberculosis* complex strain families using spoligotypes. Infect Genet Evol. 2006;6:491-504. http//dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2006.03.003
20. **Matteelli A, D'Arcy M, Sotgiuc G, Centisd R, Battista G.** Multidrug- and extensively drug-resistant TB in persons living with HIV. Expert Rev Respir Med. 2009;3:245-54. http://dx.doi.org/.10.1586/ers.09.15
21. **Walls G, Bulifon S, Breysse S, Daneth T, Bonnet M, Hurtado N, *et al*.** Drug-resistant tuberculosis in HIV-infected patients in a national referral hospital, Phnom Penh, Cambodia. Glob Health Action. 2015;8:25964. http://dx.doi.org/ 10.3402/gha.v8.25964
22. **Monge S, Díez M, Pulido F, Iribarren J, Campins A, Arazo P, *et al*.** Tuberculosis in a cohort of HIV-positive patients: Epidemiology, clinical practice and treatment outcomes. Int J Tuberc Lung Dis. 2014;8:700-8. http://dx.doi.org/ 10.1093/cid/ciu674

23. **Asencios L, Vásquez L, Leo E, Quispe N, Huaroto L, Cabezas C.** Niveles de resistencia a drogas antituberculosas en pacientes con coinfección VIH/tuberculosis, Lima, 1998-2001. Rev Per Med Exper Salud Pública. 2006;23:98-103. http://dx.doi.org/. 10.17843/rpmesp.2006.232.1068

24. **De Paz D, Potes L, Quiñónez E, Martínez L, Cepeda M, Guarín N, *et al*.** Resistencia a fármacos antituberculosis en pacientes coinfectados con tuberculosis y virus de la inmunodeficiencia humana, en un hospital de referencia de 2007 a 2010 en Cali (Colombia). Infectio. 2013;16:161-5.

25. **González J, Estrada S, Álvarez H.** Resistencia primaria a los medicamentos anti tuberculosos en pacientes VIH positivos y pacientes VIH negativos con tuberculosis en Medellín, Colombia. Infectio. 2001;5:223-34.

26. **Realpe T, Correa N, Rozo JC, Ferro BE, Gómez V, Zapata E, *et al*.** Population structure among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients in Colombia. PLoS ONE. 2014;9:e93848. http//dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093848

27. **Puerto G, Erazo L, Wintaco M, Castro C, Ribón W, Guerrero M.** *Mycobacterium tuberculosis* genotypes determined by spoligotyping to be circulating in Colombia between 1999 and 2012 and their possible associations with transmission and susceptibility to first-line drugs. PLoS ONE. 2015;10:e0124308. http//dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0124308

28. **Cerezo I, Jiménez Y, Hernández J, Zozio T, Murcia M, Rastogi N.** A first insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. Infect Genet Evol. 2012;12:657-63. http//dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.006

29. **Rosales S, Pineda-García L, Ghebremichael S, Rastogi N, Hoffner S.** Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with tuberculosis in Honduras. BMC Microbiol. 2010;10:208. http//dx.doi.org/10.1186/1471-2180-10-208

30. **Gonzalo X, Ambroggi M, Córdova E, Brown T, Poggi S, Drobniewski F.** Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*, Buenos Aires, Argentina. Emerg Infect Dis. 2011;17:528-31. http//dx.doi.org/10.3201/eid1703.100394

31. **Taype CA, Agapito JC, Accinelli RA, Espinoza JR, Godreuil S, Goodman SJ, *et al*.** Genetic diversity, population structure and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Perú. Infect Genet Evol. 2012;12:577-85. http//dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.02.002

32. **Hernández J, Murcia M, de la Hoz H.** Epidemiología molecular de la tuberculosis en Bogotá en aislamientos clínicos obtenidos durante 11 años. Rev Salud Pública. 2008;10:126-36. http://dx.doi.org/10.1590/S0124-00642008000100012

33. **Liu J, Wang HZ, Lian LL, Yu YH, Zhao XQ, Guo CP, *et al*.** Molecular characteristics and drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients co-infected with human immunodeficiency virus in Beijing, China. Biomed Environ Sci. 2015;28:222-6. http://dx.doi.org/10.3967/bes2015.030

Biomédica 2017;37:96-103
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3204

ARTÍCULO ORIGINAL

Prevalencia de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a quinolonas y fármacos inyectables en Colombia, 2012-2013

Claudia Llerena[1], Angie Zabaleta[1], Angélica Valbuena[1], Martha Murcia[2]

[1] Laboratorio de Micobacterias, Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La tuberculosis es un problema de salud pública a nivel mundial. En 2014, la Organización Mundial de la Salud estimó que se habían presentado 9,6 millones de casos nuevos y 480.000 multirresistentes. La evaluación de la resistencia a fármacos inyectables y a quinolonas se introdujo hace pocos años, por lo cual no se conoce su prevalencia.
Objetivo. Determinar la prevalencia de la resistencia a amicacina, kanamicina, capreomicina y ofloxacina en casos de tuberculosis resistente a isoniacida, rifampicina o a ambas, entre 2012 y 2013.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio de corte transversal con 489 aislamientos resistentes a isoniacida o rifampicina. Las pruebas de sensibilidad se hicieron con la técnica Bactec MGIT™. Para el análisis de la proporción de la resistencia, los casos se agruparon según el antecedente de tratamiento con medicamentos de segunda línea.
Resultados. En los 438 casos nuevos, la resistencia global a la kanamicina fue mayor (7,1 %; $IC_{95\%}$ 4,6-9,6); en los 51 casos previamente tratados, dicha resistencia fue de 27,5 % ($IC_{95\%}$ 14,2-40,7). La resistencia global fue mayor en casos con antecedentes de tratamiento con quinolonas y fármacos inyectables. Se encontraron siete casos de tuberculosis extremadamente resistente.
Conclusión. El estudio evidenció la presencia de resistencia a fármacos de segunda línea en personas con tuberculosis farmacorresistente sin tratamiento previo o tratadas previamente con quinolonas o fármacos inyectables, estos últimos con mayor porcentaje de resistencia. En consecuencia, es esencial practicar rutinariamente las pruebas de sensibilidad y el análisis de esta información.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis;* tuberculosis resistente a múltiples medicamentos; tuberculosis extremadamente resistente a drogas; isoniazida; rifampin; Colombia.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3204

Prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to quinolones and injectables in Colombia, 2012-2013

Introduction: Tuberculosis is a health problem worldwide. The World Health Organization estimated 9.6 million new cases and 480,000 multirresistant cases for 2014. The assessment of resistance to quinolones and injectables was implemented only a few years ago, so its prevalence is not known.
Objective: To determine the prevalence of resistance to amikacin, capreomycin and ofloxacin in cases of tuberculosis resistant to isoniazid and/or rifampin during 2012-2013.
Materials and methods: This was a cross-sectional study of 489 isolates resistant to isoniazid and/or rifampin. We used the Bactec MGIT™ technique for susceptibility tests. For analyzing the rate of resistance, we grouped cases according to the history of treatment with second line drugs.
Results: In the 438 new cases, the drug that showed greater overall resistance was kanamycin with 7.1 % (95% CI: 4.6 to 9.6). In 51 previously treated cases, this highest resistance was 27.5 % (95% CI: 14.2 to 40.7). The overall resistance was higher in cases with a history of treatment with quinolones and injectables. We found seven cases of extremely resistant tuberculosis.
Conclusion: This study demonstrates the presence of resistance to second line drugs in people with drug-resistant tuberculosis with and without previous treatment with quinolones and/or injectables, these latter having a higher percentage of resistance. For that reason, it is essential to perform susceptibility testing and analyze this information routinely.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis, multidrug-resistant; MDR tuberculosis; extensively drug-resistant tuberculosis; isoniazid; rifampin; Colombia.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3204

Contribución de los autores:
Claudia Llerena: concepción, diseño de los experimentos y análisis de los datos
Angie Zabaleta: desarrollo de los experimentos y análisis de los datos
Angélica Valbuena: desarrollo de los experimentos
Martha Murcia: orientación en el desarrollo de los ensayos de laboratorio
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

La tuberculosis es un problema de salud pública a nivel mundial frente al cual la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha puesto en marcha diferentes estrategias y ha llamado a los estados miembros a comprometerse en su implementación. En 1994, comenzó a promoverse la estrategia de tratamiento acortado supervisado, reemplazada posteriormente por la campaña denominada “Alto a la tuberculosis”, cuya metodología se conjugaba con los objetivos de desarrollo del milenio para lograr el control de la tuberculosis como problema de salud pública. En 2014, se lanzó la estrategia “Post 2015” en el marco del cumplimiento de los objetivos de desarrollo sostenible con la meta de alcanzar la eliminación de la enfermedad en el 2050 (1-3).

Durante el 2014, la OMS estimó en 9,6 millones los casos nuevos de tuberculosis y una incidencia de 133 casos por 100.000 habitantes en el mundo, de los cuales solo se reportaron 6,3 millones. En ese mismo año, se estimaron 480.000 casos nuevos de tuberculosis multirresistente, definida como la resistencia simultánea a isoniacida y rifampicina, de los cuales solo se notificaron 190.000. En los últimos años la notificación de casos de tuberculosis y de tuberculosis multirresistente se ha mantenido estable, al igual que la brecha entre los casos estimados y los diagnosticados (4).

La tuberculosis extremadamente resistente corresponde a casos multirresistentes con resistencia, por lo menos, a una quinolona y a un fármaco inyectable de segunda línea, los cuales equivalieron a 9,7 % de los casos de tuberculosis multirresistente notificados en el mundo en 2014. Este porcentaje está por debajo de la cifra real, pues no todos los países cuentan con un laboratorio que realice las pruebas de sensibilidad a estos fármacos (4).

Durante los últimos diez años, la incidencia de tuberculosis en Colombia ha sido estable y ha oscilado entre 23 y 25 casos por 100.000 habitantes; en 2014, el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) reportó 12.824 casos en total (5), la mayoría provenientes de Antioquia, Valle del Cauca y Bogotá.

Correspondencia:
Claudia Llerena, Laboratorio de Micobacterias, Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 220 7700, extensión 1260
cllerena@ins.gov.co

Recibido: 29/02/16; aceptado: 13/06/16

Entre 2010 y 2014, se diagnosticaron, en promedio, 150 casos por año de tuberculosis multirresistente y 250 con resistencia a isoniacida o rifampicina no catalogados como multirresistentes (6).

Desde 2009, el Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Nacional de Salud hace pruebas de sensibilidad a los fármacos de segunda línea y, a partir de 2011, se estableció que en todos los casos con resistencia a isoniacida, rifampicina o a ambas se debía determinar el patrón de resistencia a fármacos inyectables y quinolonas. Con este procedimiento, se confirmaron 37 casos de tuberculosis extremadamente resistente entre el 2009 y el 2014, así como varios casos con resistencia a quinolonas o fármacos inyectables (4,6).

La situación de la resistencia a los fármacos antituberculosos en el país no parece alarmante, aunque el número de casos de multirresistencia estimado por la OMS es de 350 y solo el 40 % de ellos se diagnostica (4).

A nivel mundial se busca garantizar el acceso a una prueba de sensibilidad que permita evaluar la resistencia a quinolonas y fármacos inyectables en todos los casos de tuberculosis multirresistente, pues esta prueba solo se hace en 24 % de los casos (4). En Colombia, el Laboratorio Nacional de Referencia estableció que los laboratorios de salud pública deben enviar los aislamientos de todos los casos de tuberculosis resistente diagnosticados, con el fin de evaluar su resistencia a fármacos de segunda línea; sin embargo, solo se ha logrado una cobertura del 60 %.

El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a la kanamicina, la amicacina, la capreomicina y la ofloxacina en casos de tuberculosis resistentes a isoniacida, rifampicina, o a ambas, recibidos en el Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Nacional de Salud en 2012 y 2013.

Materiales y métodos

Tipo de estudio

Se hizo un estudio retrospectivo descriptivo de corte transversal.

Se analizaron 489 aislamientos de *M. tuberculosis* remitidos por los laboratorios de salud pública del país y se seleccionaron aquellos que presentaban resistencia a isoniacida, rifampicina o a ambas.

Se excluyeron los que tenían repetida la prueba de sensibilidad y no presentaban cambio en el patrón de resistencia, así como aquellos en los cuales, a

pesar de la resistencia a isoniacida, rifampicina o a ambas, no fue posible obtener un resultado debido a la contaminación o a resultados que no se podían interpretar.

Pruebas de sensibilidad

Los aislamientos se recibieron en medio de cultivo sólido y se sometieron a la prueba de sensibilidad con la técnica semiautomatizada Bactec MGIT™, siguiendo las instrucciones del fabricante; en esta prueba se emplea un tubo que contiene caldo Middlebrook 7H9 y un compuesto de rutenio fluorescente incluido en silicona. La prueba opera mediante la acción de consumo de oxígeno por parte de la micobacteria, que libera la fluorescencia del compuesto y permite detectar su viabilidad al ser expuesta a los fármacos y determinar si es sensible o resistente.

Las concentraciones críticas usadas fueron las siguientes: isoniacida, 0,1 y 0,4 µg/ml; rifampicina, 1 µg/ml; kanamicina, 2,5 µg/ml; amicacina, 1,0 µg/ml; capreomicina, 2,5 µg/ml, y ofloxacina, 2,0 µg/ml. La interpretación de los resultados se hizo con el programa TB-eXIST™, facilitado por la casa comercial (7-9).

Los resultados obtenidos en las pruebas se remitieron por correo electrónico a los laboratorios de salud pública de donde provenían los aislamientos.

Análisis estadístico de los datos

Se utilizaron tres fuentes de información: la primera, el formato único de vigilancia de las micobacterias, documento establecido en el Instituto Nacional de Salud para el procesamiento de las pruebas de sensibilidad, con el cual se remiten los aislamientos, y contiene la información sobre el sexo, la edad, la forma clínica de la enfermedad, el ente territorial remitente y los antecedentes de tratamiento con fármacos antituberculosos, datos que deben ser recopilados por el personal de salud en la institución donde se atiende al paciente; la segunda, los resultados de las pruebas de sensibilidad sobre los patrones de resistencia a los fármacos, y la tercera, la base de datos de resultados de las pruebas de sensibilidad del Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto.

Para el análisis de la información, los casos se clasificaron como resistentes a isoniacida, rifampicina o a ambas, o como multirresistentes, y se agruparon según si los pacientes habían recibido tratamiento con medicamentos de segunda línea. La definición de pacientes sin tratamiento y previamente tratados se ajustó al formato único o a los datos de la base de datos de las pruebas de sensibilidad del Laboratorio Nacional de Referencia.

Se empleó el programa Epidat 3.1 para calcular la proporción de resistencia a cada fármaco y a diferentes combinaciones, así como la resistencia global, con un intervalo de confianza del 95 %. Se utilizó la prueba de diferencia de proporciones entre la resistencia global para quinolonas y fármacos inyectables de los pacientes no tratados y de los previamente tratados con fármacos de segunda línea, con un intervalo de confianza de 95 % y una significación estadística de $p<0,05$.

Se determinó la procedencia de los aislamientos según el ente territorial, el tipo de tuberculosis (pulmonar, extrapulmonar), la edad, el sexo y la presencia de infección por HIV.

Resultados

Los casos se agruparon como no tratados (438; 89,5 %) y como previamente tratados con medicamentos de segunda línea (51; 10,5 %).

En los 438 aislamientos de casos no tratados, se encontró una resistencia global a kanamicina de 7,1 % ($IC_{95\%}$ 4,6-9,6), seguida por una resistencia a amicacina, capreomicina y ofloxacina de 1,8 % ($IC_{95\%}$ 0,4-3,2) para cada uno de estos fármacos. No se detectaron casos de tuberculosis extremadamente resistente en este grupo, pero sí 22 (5 %) de tuberculosis resistente a la quinolona o a alguno de los fármacos inyectables evaluado (cuadro 1).

Los casos con resistencia a isoniacida fueron 239, de los cuales 222 (93,0 %) eran sensibles a los medicamentos de segunda línea evaluados, 10 (4,2 %) presentaron resistencia solo a kanamicina, uno (0,4 %) a amicacina, dos (0,8 %) a capreomicina y uno (0,4 %) a ofloxacina; además, se encontró un (0,4 %) caso con resistencia combinada a kanamicina y amicacina, y dos (0,8 %) resistentes a los tres fármacos inyectables evaluados (cuadro 1).

Se encontraron 32 casos resistentes a rifampicina, de los cuales 28 (87,5 %) fueron sensibles a los medicamentos de segunda línea evaluados, cuatro (12,5 %) tenían resistencia solo a kanamicina, y ninguno a los otros medicamentos (cuadro 1).

Se registraron 167 casos de tuberculosis multirresistente, de los cuales 145 (86,8 %) eran sensibles a los medicamentos evaluados, nueve (5,4 %)

Cuadro 1. Comportamiento de la resistencia de *M. tuberculosis* a las quinolonas y fármacos inyectables en los casos de tuberculosis resistente

Casos no tratados					
Perfil de resistencia	**Resistentes a isoniacida (N=239)**	**Resistentes a rifampicina (N=32)**	**Tuberculosis multirresistente (N=167)**	**Total (N=438)**	**Intervalos de confianza de 95 %**
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**	
Sensibles a quinolonas y fármacos inyectables	222 (93,0)	28 (87,5)	145 (86,8)	395 (90,2)	87,3-93,1
Resistencia a un medicamento					
Kanamicina	10 (4,2)	4 (12,5)	9 (5,4)	23 (5,3)	3,0-7,4
Amicacina	1 (0,4)	0	0	1 (0,2)	0,006-1,3
Capreomicina	2 (0,8)	0	1 (0,6)	3 (0,7)	0,1-2,0
Ofloxacina	1 (0,4)	0	7 (4,2)	8 (1,8)	0,5-3,2
Resistencia combinada					
Kanamicina más amicacina	1 (0,4)	0	2 (1,2)	3 (0,7)	0,1-2,0
Kanamicina más capreomicina	0	0	1 (0,6)	1 (0,2)	0,006-1,3
Kanamicina más amicacina más capreomicina	2 (0,8)	0	2 (1,2)	4 (0,9)	0,2-2,3
Resistencia global por medicamento					
Resistencia a kanamicina	13 (5,4)	4 (12,5)	14 (8,4)	31 (7,1)	4,6-9,6
Resistencia a amicacina	4 (1,7)	0	4 (2,4)	8 (1,8)	0,4-3,2
Resistencia a capreomicina	4 (1,7)	0	4 (2,4)	8 (1,8)	0,4-3,2
Resistencia a ofloxacina	1 (0,4)	0	7 (4,2)	8 (1,8)	0,4-3,2

Casos previamente tratados					
Perfil de resistencia	**Resistentes a isoniacida (N=13)**	**Resistentes a rifampicina (N=1)**	**Tuberculosis multirresistente (N=37)**	**Total (N=51)**	**Intervalos de confianza de 95 %**
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**	
Sensibles a quinolonas y fármacos inyectables	9 (69,2)	1 (100)	17 (45,9)	27 (52,9)	38,3-67,6
Resistencia a un medicamento					
Kanamicina	1 (7,7)	0	3 (8,1)	4 (7,8)	2,2-18,9
Capreomicina	1 (7,7)	0	1 (2,7)	2 (3,9)	0,5-13,5
Ofloxacina	1 (7,7)	0	5 (13,5)	6 (11,8)	1,9-21,6
Resistencia combinada					
Kanamicina más ofloxacina	0	0	1 (2,7)	1 (1,9)	0,05-10,4
Capreomicina más ofloxacina	0	0	1 (2,7)	1 (1,9)	0,05-10,4
Kanamicina más amicacina más capreomicina	1 (7,7)	0	4 (10,8)	5 (9,8)	3,3-21,4
Kanamicina más amicacina más ofloxacina	0	0	1 (2,7)	1 (1,9)	0,05-10,4
Kanamicina más amicacina más capreomicina más ofloxacina	0	0	4 (10,8)	4 (7,8)	2,2-18,9
Resistencia global por medicamento					
Resistencia a kanamicina	2 (15,4)	0	12 (7,9)	14 (27,5)	14,2-40,7
Resistencia a amicacina	1 (7,7)	0	8 (5,3)	9 (17,6)	6,2-29,1
Resistencia a capreomicina	2 (15,4)	0	9 (6,0)	11 (21,6)	9,3-33,8
Resistencia a ofloxacina	1 (7,7)	0	10 (6,6)	11 (21,6)	9,3-33,8

eran resistentes solo a kanamicina, siete (4,2 %) a ofloxacina y uno (0,6 %) a capreomicina; además, se identificaron dos (1,2 %) casos con resistencia combinada a kanamicina y a amicacina, uno (0,6 %) a kanamicina y capreomicina y dos (1,2 %) a los fármacos inyectables evaluados (cuadro 1).

Entre los 51 casos considerados como previamente tratados, se encontró una resistencia global a la kanamicina de 27,5 % ($IC_{95\%}$ 14,2-40,7), seguida por la ofloxacina y la capreomicina con 21,6 % ($IC_{95\%}$ 9,3-33,8) para cada una; la resistencia a la amicacina fue de 17,6 % ($IC_{95\%}$ 6,2-29,1). Se identificaron siete (13,7 %) casos de tuberculosis extremadamente resistente y 13 (25,5 %) de tuberculosis resistente (cuadro 1).

Los casos con resistencia a isoniacida fueron 13; de ellos, nueve (69,2 %) eran sensibles a los medicamentos de segunda línea evaluados; solo se encontró uno (7,7 %) resistente a kanamicina, otro a amicacina y uno más a ofloxacina. Además, se encontró un (7,7 %) caso con resistencia combinada a los tres fármacos inyectables evaluados. Solo hubo un caso resistente a rifampicina, pero sensible a los fármacos evaluados (cuadro 1).

Se estudiaron 37 casos multirresistentes, 17 (45,9 %) de los cuales eran sensibles a los medicamentos evaluados. Solo se encontraron tres (8,1 %) casos resistentes únicamente a kanamicina, uno (2,7 %) a capreomicina y cinco (13,5%) a ofloxacina; además, se detectó uno (2,7 %) con resistencia combinada a kanamicina y ofloxacina, otro a capreomicina y ofloxacina, y cuatro (10,8 %) resistentes a todos los fármacos inyectables evaluados (cuadro 1).

La resistencia global a quinolonas y fármacos inyectables en los casos nuevos fue de 9,8 % ($IC_{95\%}$ 6,9-12,7) y en los previamente tratados fue de 47,0 % ($IC_{95\%}$ 32,3-61,7), con diferencias estadísticamente significativas (p<0,001) entre ellos.

Los 489 casos provenían de 29 entes territoriales, la mayoría de Antioquia con 137 (28 %) y Valle del Cauca con 102 (20,9 %), seguidos por 30 (6,1 %) de Santander, 28 (5,7 %) de Bogotá y 27 (5,5 %) de Atlántico (cuadro 2). Durante este periodo no se encontraron casos de tuberculosis resistente en los departamentos de Guainía, Vichada, Vaupés ni Amazonas.

Se registraron 430 (87,9 %) casos de tuberculosis pulmonar; la mediana de edad fue de 42 años (rango, 1 a 92 años), y 51,9 % de los pacientes tenía entre 15 y 44 años; 327 (66,9 %) eran de sexo masculino y la infección concomitante con el HIV se evidenció en 66 (13,5 %), pero no se contó con dicha información en 181 (37,0 %) (cuadro 2).

Cuadro 2. Descripción de las variables sociodemográficas de los casos de tuberculosis farmacorresistente

Variable	Casos (N=489) n (%)
Procedencia (ente territorial)	
Antioquia	137 (28,0)
Valle del Cauca	102 (20,9)
Santander	30 (6,1)
Bogotá	28 (5,7)
Atlántico	27 (5,5)
Norte de Santander	21 (4,3)
Risaralda	20 (4,1)
Cesar	13 (2,7)
Quindío	13 (2,7)
La Guajira	11 (2,2)
Nariño	11 (2,2)
Bolívar	10 (2,0)
Chocó	8 (1,6)
Tolima	8 (1,6)
Putumayo	7 (1,4)
Cauca	6 (1,2)
Córdoba	6 (1,2)
Huila	6 (1,2)
Magdalena	5 (1,0)
Meta	5 (1,0)
Casanare	4 (0,8)
Cundinamarca	3 (0,6)
Sucre	2 (0,4)
Arauca	1 (0,2)
Boyacá	1 (0,2)
Caldas	1 (0,2)
Caquetá	1 (0,2)
Guaviare	1 (0,2)
San Andrés y Providencia	1 (0,2)
Tipo de tuberculosis	
Pulmonar	430 (87,9)
Extrapulmonar	46 (9,4)
Sin dato	13 (2,7)
Edad (años)	
0-14	9 (1,8)
15-29	112 (22,9)
30-44	142 (29,0)
45- 59	128 (26,2)
Mayores de 60	79 (16,2)
Sin dato	19 (3,9)
Sexo	
Femenino	162 (33,1)
Masculino	327 (66,9)
Infección concomitante de tuberculosis y HIV	
Sí	66 (13,5)
No	242 (49,5)
Sin dato	181 (37,0)

Discusión

Este estudio constituye la línea de base para determinar la prevalencia de la resistencia de *M. tuberculosis* a las quinolonas y fármacos inyectables en el país, entre 2012 y 2013.

Se encontró una mayor resistencia en los casos con antecedente de tratamiento que en los no tratados. Se evidenciaron casos de tuberculosis extremadamente resistente, la cual es una forma grave de la enfermedad en términos de epidemiología y salud pública. Aunque se desconoce si estos individuos tuvieron interrupciones en sus esquemas de tratamiento, es posible que estos hallazgos estén relacionados con las dificultades que se presentan en la administración de las dosis de medicamentos, las cuales deben darse, aproximadamente, durante 24 meses en los casos de resistencia. En muchas ocasiones, la continuidad del tratamiento se ve afectada por los trámites del sistema de salud y el compromiso del paciente para cumplirlo (10-12).

El fármaco con mayor resistencia en los casos de tuberculosis no tratados fue la kanamicina, que es el fármaco inyectable de elección en el manejo de los casos con multirresistencia, según lo establecido en la guía de manejo programático del Programa Nacional de Tuberculosis (12,13).

La presencia de casos con resistencia a quinolonas o fármacos inyectables, constituye una alerta frente a la intensificación de la resistencia a los

fármacos, por lo cual es importante garantizar un adecuado seguimiento de estos pacientes para lograr su curación y evitar que aumente el perfil de resistencia (10-12).

Al revisar la literatura científica sobre la resistencia a quinolonas y fármacos inyectables, se encontraron estudios de casos de tuberculosis multirresistente en los cuales no se diferenció entre los previamente tratados con estos medicamentos y aquellos no tratados. El reporte global de tuberculosis para 2014 indica que de los 83 países con estrategias de vigilancia de la resistencia a estos medicamentos en casos de multirresistencia, en 40 se diagnosticaron más de 10 casos anuales de multirresistencia; la proporción de resistencia a las quinolonas (ofloxacina, moxifloxacina y levofloxacina) fue de 21 % ($IC_{95\%}$ 8,3-34), porcentaje similar a lo observado en el presente trabajo en casos previamente tratados (4).

En varios trabajos se ha documentado la presencia de resistencia a quinolonas y fármacos inyectables en regiones con alta prevalencia de tuberculosis resistente. Li, *et al.*, evaluaron la presencia de resistencia a trece medicamentos de primera y segunda línea en 92 aislamientos de pacientes con tuberculosis en la provincia de Guizhou en China, y encontraron que 41,3 % presentaba resistencia a quinolonas, principalmente a ciprofloxacina, y 18,4 % a los fármacos inyectables. China presenta una alta prevalencia de resistencia a los fármacos antituberculosos, lo cual explica los altos porcentajes en comparación con los datos del presente estudio (14).

En un hospital de Pakistán, Nafes, *et al.,* estudiaron la sensibilidad a quinolonas y fármacos inyectables en 243 pacientes con tuberculosis multirresistente, y encontraron que la resistencia a ofloxacina fue del 52,7 %, a capreomicina de 1,2 %, y a kanamicina y amicacina de 0,8 % en cada una, datos que no se analizaron considerando el antecedente de tratamiento previo con estos medicamentos. Al compararlos con los obtenidos en Colombia, se evidenció que la resistencia a la ofloxacina fue mucho mayor en todos los grupos conformados en este estudio, lo cual podría explicarse porque Pakistán es uno de los países con mayor carga de tuberculosis y tuberculosis multirresistente (15,16).

Dalal, *et al.*, evaluaron el porcentaje de resistencia a fármacos inyectables y quinolonas en 340 casos multirresistentes, durante un periodo de ocho años, en Mumbai, India, y encontraron 16,5 % de resistencia a kanamicina, 14 % a amicacina, 12,4 % a capreomicina y 61,9 % a ofloxacina. Al igual que en los trabajos ya mencionados, estos datos son reflejo de la epidemia de tuberculosis resistente a la que se enfrentan otras regiones del mundo, y difieren de los reportados en el presente estudio en términos de prevalencia. A pesar de esto, los datos que aquí se presentan deben alertar al programa nacional para mejorar las acciones de control de la enfermedad y, así, evitar una emergencia por resistencia a fármacos (17).

En Georgia, Kempeker, *et al.*, evaluaron 158 pacientes con tuberculosis multirresistente y encontraron que el 44 % había recibido tratamiento previo con medicamentos antituberculosos y había resistencia a kanamicina y amicacina en 33 % de ellos, y a ofloxacina en el 6 %, porcentajes similares a los de este estudio en el caso de los fármacos inyectables, aunque aquí se analizó la resistencia total sin diferenciar según los antecedentes de tratamiento con fármacos de segunda línea (18).

En un estudio de Asencios, *et al.*, se evaluó la prevalencia de la resistencia a fármacos de segunda línea en casos de tuberculosis multirresistente durante 2005 y 2006, en el Perú. Se estudiaron 2.169 casos, de los cuales 36,2 % presentaba resistencia, por lo menos, a un fármaco, principalmente a la etionamida y a la kanamicina; aunque no se analizó el antecedente de exposición a medicamentos de segunda línea, se encontró resistencia a la ciprofloxacina en 10,1 % de los casos (19). Con estos datos debidamente actualizados, Castillo, *et al.*, elaboraron un documento con algunas pautas para el control de esta forma de la enfermedad en un país donde la prevalencia de la resistencia es la más alta de la región (20).

Estos hallazgos se asemejan a los de este estudio en el caso de los fármacos inyectables, pues se encontró mayor porcentaje de resistencia a las quinolonas y se estableció que la exposición previa a estas se relaciona con mayores tasas de resistencia, especialmente en los pacientes previamente tratados (21,6 %). Además, el 3,4 % de los casos multirresistentes estudiados en Colombia presentaron tuberculosis extremadamente resistente, porcentaje alto si se tiene en cuenta que el total de casos evaluados y el periodo de análisis de los datos fueron menores que los del estudio de Perú, donde la prevalencia de este tipo de tuberculosis en 10 años fue de 6,4 % (19,20).

En un trabajo de Cegielski, *et al.*, que buscaba establecer la relación entre el resultado de la enfermedad y el esquema de tratamiento en 1.244 casos de tuberculosis multirresistente, también

en Perú, se encontró que en aquellos casos en los que se habían hecho estas pruebas, el éxito del tratamiento había sido de 85,8 % en los sensibles, de 69,7 % en aquellos con resistencia inicial a alguna quinolona, de 37,5 % en casos de tuberculosis resistente y de 29,3 % en los casos extremadamente resistentes. Estos datos evidencian la necesidad de mejorar el acceso de los pacientes a dichas pruebas, en especial, porque proporcionan información clínicamente útil para orientar la selección de los esquemas de tratamiento, aunque las posibilidades de curación disminuyen con la presencia de formas de resistencia más graves (21,22). En Colombia, la curación de los casos multirresistentes no supera el 50 %, pero no se sabe si ello está relacionado con la ausencia de pruebas de sensibilidad o con la efectividad de los esquemas de tratamiento (4).

Dado que los fármacos antituberculosos de segunda línea se emplean en el manejo de otras enfermedades, es importante conocer el comportamiento de la resistencia. En este sentido, Ho, *et al.*, evaluaron en Australia el perfil de resistencia a los medicamentos de primera línea y a las quinolonas en 357 casos nuevos, y encontraron 0,3 % de resistencia a isoniacida, 11 % de tuberculosis multirresistente y 0,6 % de resistencia a quinolonas en casos sensibles a los fármacos de primera línea. Australia es un país donde las tasas de resistencia a los medicamentos antituberculosos son bajas; sin embargo, este tipo de hallazgos alerta sobre la necesidad de mejorar la vigilancia en casos nuevos, especialmente, cuando las quinolonas se proponen como una alternativa terapéutica para reducir el tiempo actual de los esquemas de tratamiento (23).

Para el Programa Nacional de Control de la Tuberculosis es primordial fortalecer la vigilancia por el laboratorio de la resistencia a estos medicamentos en todos los casos que presenten resistencia a isoniacida, rifampicina o a ambas, pues los datos aquí analizados indican tasas altas en algunos casos, lo que, sumado a la ausencia de nuevos medicamentos y a la duración actual del tratamiento, constituye una amenaza para el control de la enfermedad. A pesar de que las nuevas metas de eliminación de la tuberculosis establecidas por la OMS consideran la implementación de nuevos esquemas de tratamiento, se ha emitido la recomendación de usar otros medicamentos en los casos multirresistentes, bajo la premisa fundamental de evaluar la resistencia a quinolonas y fármacos inyectables mediante métodos rápidos de detección del ADN con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, los cuales deben confirmarse mediante los métodos convencionales como el Bactec MGIT™. Estas recomendaciones también incluyen las acciones de seguimiento del paciente y sus contactos (24,25).

El uso indiscriminado de antibióticos es una práctica que debe ser controlada en términos de salud pública. En este contexto, la resistencia y el desarrollo de otros mecanismos de defensa de los microrganismos patógenos disminuyen la efectividad de los medicamentos disponibles. En el caso específico de la tuberculosis, es necesario que se fortalezcan las actividades de vigilancia y se analice periódicamente la información, así como el manejo adecuado de los esquemas de tratamiento en los casos sensibles y resistentes para disminuir las probabilidades de extender la resistencia. Asimismo, es necesario mantener actualizadas las guías y los protocolos de manejo de los pacientes (15,26,27).

Agradecimientos

A los profesionales y al equipo de administrativo de las secretarías de salud, así como a los laboratorios de salud pública participantes, y al Laboratorio de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existen conflictos de intereses.

Financiación

Este proyecto fue financiado por el Instituto Nacional de Salud de Colombia.

Referencias

1. **World Health Organization.** What is DOT? A guide to understanding the WHO-recommended TB control strategy known as DOTS. Fecha de consulta: 28 de diciembre de 2015. Disponible en: http://apps.who.int/iris/handle/10665/65979

2. **World Health Organization.** Plan Mundial para Detener la Tuberculosis, 2006-2015. Ginebra: WHO 2006. Fecha de consulta: 28 de diciembre de 2015. Disponible en: http://apps.who.int/iris/handle/10665/43438

3. **World Health Organization.** Global tuberculosis control: Surveillance, planning, financing. Fecha de consulta: 28 de diciembre de 2015. Disponible en: http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=15&codcch=3659

4. **World Health Organization.** Global tuberculosis control WHO report – 2015. Fecha de consulta: 28 de diciembre de 2015. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1

5. **Instituto Nacional de Salud.** Informe final. Tuberculosis, Colombia - 2014. Fecha de consulta: 28 de diciembre de 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiolgico/Tuberculosis%202014.pdf

6. **Instituto Nacional de Salud.** Tuberculosis farmacorresistente. Nuevo evento de notificación obligatoria. Código 825 – 2013. Fecha de consulta: 28 de diciembre de 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/Noticias/Memorias%20Reunin%20Nacional%20de%20Vigilancia%20y%20Control%20e/2-3-TB%20resistente.pdf

7. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and other aerobic Actinomycetes. Approved standard. Second Edition. Wayne: CLSI: 2011.

8. **Becton Dickinson.** Inserto, técnica de MGIT 960® para evaluación de resistencia a fármacos antituberculosos. Heidelberg: Becton Dickinson; 2009.

9. **Becton Dickinson.** Manual Epicenter, técnica de MGIT 960® para evaluación de resistencia a fármacos antituberculosos. Heidelberg: Becton Dickinson; 2009.

10. **Caminero J.** Likelihood of generating MDR-TB and XDR-TB under adequate national tuberculosis control programme implementation. Int J Tuberc Lung Dis. 2008;12:869-77.

11. **Caminero J.** Multidrug-resistant tuberculosis: Epidemiology, risk factor and case finding. Int J Tuberc Lung Dis. 2010;14: 382-90.

12. **Torres C, Awad C**, **Dennis R, Varón F.** Lineamiento para el manejo programático de pacientes con tuberculosis farmacorresistente. Fecha de consulta: 28 de diciembre de 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/micobacterias/Lineamientos%20manejo%20de%20Tuberculosis%20Farmacorresistente.pdf

13. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Circular 001 del 8 de enero de 2013. Lineamientos para el manejo programático de los medicamentos de segunda línea para tuberculosis farmacorresistente en Colombia. Fecha de consulta: 28 de diciembre de 2015. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/circular-001-2013.pdf

14. **Li N, Liao X, Chen L, Wang J, Liu M, Zhang H.** Antibiotic susceptibility patterns of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Guizhou province of China against 13 antituberculosis drugs. Microb Drug Resist. 2015;21:292-6. http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2014.0094

15. **Nafees A, Arshad J, Syed A, Syed S, Long C, Izaz A, *et al*.** Resistance patterns, prevalence, and predictors of fluoroquinolones resistance in multidrug resistant tuberculosis patients. Braz J Infect Dis. 2016;20:41-7. http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2015.09.011

16. **Jabeen K, Shakoor S, Malik F, Hasan R.** Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Pakistan 2010-2014: Implications for disease control. Int J Mycobacteriol. 2015;4(Suppl.1):47-8. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.10.046

17. **Dalal A, Pawaskar A, DasM, Desai R, Prabhudesai P, Chhajed, *et al*.** Resistance patterns among multidrug-resistant tuberculosis patients in greater metropolitan Mumbai: Trends over time. PLoS One. 2015;10:e0116798. http://dx.doi.org.1371/journal.pone.0116798

18. **Kempker R, Kipiani M, Mirtskhulava V, Tukvadze N, Magee M, Blumberg H.** Acquired drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and poor outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis. Emerg Infect Dis. 2015;21:992-1001. http://dx.doi.org/10.3201/eid2106.141873

19. **Asencios L, Quispe N, Mendoza A, Leo E, Vásquez L.** Vigilancia nacional de la resistencia a medicamentos antituberculosos, Perú, 2005-2006. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2009;26:278-87.

20. **Del Castillo H, Mendoza A, Saravia J, Somocurcio J.** Epidemia de tuberculosis multidrogo resistente y extensivamente resistente a drogas (TB MDR/XDR) en el Perú: situación y propuestas para su control. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2009;26:380-6.

21. **Barletta F, Zamudio C, Rigouts L, Seas C.** Resistencia a drogas de segunda línea en cepas peruanas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogorresistentes. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2014;31:676-82.

22. **Bastos M, Hussain H, Weyer K, García L, Leimane V, Leung CC, *et al*.** Treatment outcomes of patients with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis according to drug susceptibility testing to first- and second-line drugs: An individual patient data meta-analysis. Clin Infect Dis. 2014;59:1364-74. http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciu619

23. **Ho J, Jelfs P, Sintchenko V.** Fluoroquinolone resistance in non-multidrug-resistant tuberculosis a surveillance study in New South Wales, Australia, and a review of global resistance rates. Int J Infect Dis. 2014;26:149-53 http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2014.03.1388

24. **World Health Organization.** The shorter MDR-TB regimen. Fecha de consulta: 14 de mayo de 2016. Disponible en: http://www.who.int/tb/Short_MDR_regimen_factsheet.pdf?ua=1

25. **World Health Organization.** Tuberculosis diagnostics molecular line-probe assay for the detection of resistance to second-line anti-TB drugs (SL-LPA). Fecha de consulta: 14 de mayo de 2016]. Disponible en: http://www.who.int/tb/Factsheet_SLLPAfinal.pdf?ua=1

26. **Álvarez D, Hernández S, Garza M, Vázquez R.** Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. Rev Chil Infectol. 2015;32:499-504. http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182015000600002

27. **Jabeen K, Shakoor S, Hasan R.** Fluoroquinolone-resistant tuberculosis: Implications in settings with weak healthcare systems. Int J Infect Dis. 2015;32:118-23. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2015.01.006

Biomédica 2017;37:104-10
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3025

ARTÍCULO ORIGINAL

Adaptación transcultural del cuestionario de puntuación de la neumonía adquirida en la comunidad en pacientes con neumonía leve a moderada en Colombia

Mónica Alejandra Bernal-Vargas[1], Jorge Alberto Cortés[1,2], Ricardo Sánchez[3]

[1] Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Departamento de Medicina Interna, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
[3] Departamento de Psiquiatría, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Entre las estrategias para el uso racional de antibióticos se encuentra el cuestionario de puntuación de la neumonía adquirida en la comunidad, instrumento de evaluación clínica de los pacientes que ayuda a tomar la decisión de retirar los antibióticos de forma segura y temprana.
Objetivo. Traducir al español y hacer la adaptación transcultural del cuestionario de puntuación de la neumonía adquirida en la comunidad.
Materiales y métodos. Se obtuvo la autorización para la adaptación transcultural del cuestionario de puntuación de la neumonía adquirida en la comunidad; se acogieron las recomendaciones del *International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research* y de la *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*, siguiendo las siguientes fases: traducción directa, conciliación, traducción inversa, armonización, obtención de la versión provisional en español y aplicación de esta en una prueba piloto. La prueba piloto se hizo en un hospital público de segundo nivel en Bogotá, previa aprobación de los comités de ética e investigación.
Resultados. Se introdujeron las modificaciones sugeridas por los traductores en la fase de traducción directa; en la traducción inversa no se encontraron discordancias que requirieran la revisión de la traducción inicial. Se modificaron cinco ítems del cuestionario, con base en las sugerencias de los 11 pacientes hospitalizados con diagnóstico de neumonía adquirida en la comunidad participantes en la prueba piloto.
Conclusiones. Se dispone de una versión en español del cuestionario de puntuación de la neumonía adquirida en la comunidad adaptada a las condiciones culturales locales.

Palabras clave: neumonía; antibacterianos; adulto; terapia; resultado del tratamiento; comparación transcultural; encuestas y cuestionarios; traducción.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3025

Cross-cultural adaptation of the community-acquired pneumonia score questionnaire in patients with mild-to-moderate pneumonia in Colombia

Introduction: One of the strategies for the rational use of antibiotics is the use of the score for community-acquired pneumonia (CAP Score). This instrument clinically evaluates patients with community-acquired pneumonia, thereby facilitating decision making regarding the early and safe withdrawal of antibiotics.
Objective: To generate a translation and cross-cultural adaptation of the Community-Acquired Pneumonia (CAP) Score questionnaire in Spanish.
Materials and methods: Authorization for cross-cultural adaptation of the Community-Acquired Pneumonia (CAP) Score questionnaire was obtained; the recommendations of the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research (ISPOR) and the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) were carried out through the following stages: forward translation, reconciliation, backward translation, harmonization, obtaining a provisional questionnaire, and applying the questionnaire in a pilot test. The pilot test was conducted at a second-level public hospital in Bogotá after the study was approved by the ethics and research institutional boards.

Contribución de los autores:
Mónica Bernal-Vargas y Jorge Alberto Cortés: ejecución del proyecto
Ricardo Sánchez: diseño del estudio y análisis de los resultados
Todos los autores participaron en el diseño del estudio y en la escritura del manuscrito

Results: The changes suggested by the forward translators were applied. There were no discrepancies between the backward and forward translations, consequently, no revisions were necessary. Five items had modifications based on suggestions made by eleven patients hospitalized with a diagnosis of community-acquired pneumonia during the pilot test.
Conclusions: A Spanish version of the Community-Acquired Pneumonia (CAP) Score was cross-culturally adapted and is now available.

Key words: Pneumonia; anti-bacterial agents; adult; therapy; treatment outcome; cross-cultural comparison; surveys and questionnaires; translating.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3025

Anualmente, las infecciones de las vías respiratorias inferiores cobran la vida, aproximadamente, de 1,6 millones de personas mayores de 59 años en el mundo, es decir, 4 % de todas las muertes. En Latinoamérica, los fallecimientos pueden llegan al 6 % (1). La neumonía adquirida en la comunidad representa la sexta causa de muerte y la primera por enfermedad infecciosa en Colombia, y ocupa el quinto lugar como causa de hospitalización (2,3). En un reciente estudio llevado a cabo en tres instituciones colombianas, se estimó que el costo generado por un paciente hospitalizado por neumonía adquirida en la comunidad era de aproximadamente USD$ 6.200, de los cuales USD$ 2.600 correspondían al tratamiento médico y 36 % de dicho costo se atribuía al tratamiento antibiótico (4).

Dados los costos y los problemas relacionados con la hospitalización (reacciones adversas, infecciones asociadas a la atención en salud, etc.), así como los problemas de resistencia bacteriana, se han establecido programas que promueven el uso racional de los antibióticos con el fin de disminuir la exposición a ellos y, consecuentemente, el riesgo de resistencia y de complicaciones relacionadas con su uso, la necesidad de hospitalización y los costos.

Entre las estrategias, se encuentra el acortamiento de los esquemas de tratamiento antibiótico (5). En múltiples estudios se ha buscado establecer la forma de disminuir la duración del tratamiento antimicrobiano y mantener la misma efectividad de los esquemas prolongados, con la subsiguiente reducción de los costos del tratamiento de este tipo de neumonía (5).

Correspondencia:
Jorge Alberto Cortés, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 N° 45-03, Ciudad Universitaria, oficina 510, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono:(571) 316 5000, extensión 15011
jacortesl@unal.edu.co

Recibido: 14/03/16; aceptado: 14/06/16

Para determinar el momento de suspensión del antibiótico, se han propuesto criterios de estabilidad clínica que ayudan al médico a decidirlo. Entre dichos criterios se cuentan parámetros clínicos, como la presión arterial o la frecuencia cardiaca, así como algunos criterios paraclínicos, como el conteo de leucocitos (6). Ninguna de las propuestas incluidas en las guías para establecer el momento ideal de suspensión del antibiótico involucra aspectos como la resolución de los síntomas o el bienestar del paciente, lo cual afecta su calidad de vida y debería tomarse en cuenta al determinar el momento apropiado para finalizar el tratamiento antibiótico.

Uno de los instrumentos para la evaluación clínica de pacientes con neumonía adquirida en la comunidad es el cuestionario de puntuación de esta condición (*Community Acquired Pneumonia Score*, CAP Score) (7) (anexo 1, disponible en: doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3025), el cual incluye seis ítems que evalúan las características psicométricas y que fue probado en un ensayo clínico aleatorio (8). En dicho estudio se emplearon los seis ítems como criterios de inclusión para la asignación aleatoria de un tratamiento antibiótico acortado o del tratamiento convencional. El estudio demostró que con las respuestas al cuestionario era posible suspender el antibiótico de forma segura y acortar el tratamiento de forma efectiva.

Con base en estos resultados, se eligió el cuestionario de puntuación de la neumonía adquirida en la comunidad para su adaptación transcultural como un primer paso en su validación y eventual aplicación en contextos clínicos y de investigación, considerando, además, que hasta donde se sabe, este no ha sido validado en Colombia ni en otros países hispanohablantes.

Materiales y métodos

En el proceso de traducción y adaptación transcultural, se siguieron las recomendaciones del manual para traducciones y adaptaciones transculturales de la *International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research* (ISPOR) (9) y las de la

European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) (10), en las fases que se mencionan a continuación.

Permiso para la adaptación transcultural del cuestionario original

Se obtuvo la autorización de uno de los autores, el doctor B. C. Opmeer, para la validación del cuestionario de puntuación de la neumonía adquirida en la comunidad mediante intercambio epistolar por correo electrónico.

Traduccion directa

Dos traductores hispanohablantes, un médico especialista en medicina interna y un médico general, ambos colombianos, tradujeron el cuestionario de inglés a español de forma independiente. Se les solicitó que no incluyeran palabras técnicas en las traducciones y que estas fueran de fácil comprensión para los pacientes.

Conciliación

El investigador principal de este estudio se encargó de comparar y evaluar las dos versiones traducidas del instrumento, incorporó las modificaciones en las que hubo consenso entre los traductores, y evaluó las discrepancias para discutirlas, intentando preservar la equivalencia con la versión original. No hubo necesidad de incorporar un tercer evaluador, ya que se logró un consenso en torno a las diferencias entre las versiones. El resultado fue una traducción provisional que se utilizó para la traducción inversa.

Traducción inversa

Otros dos traductores anglohablantes con gran dominio del español, que no conocían el cuestionario original, tradujeron de forma independiente la versión provisional de español a inglés. Una era una traductora con experiencia en validación de escalas en “clinimetría” y el otro era un traductor con experiencia en traducción de documentos médicos.

Armonización

El investigador principal comparó la traducción inversa con el documento original para detectar las diferencias que debían discutirse con los traductores. Dada la semejanza entre las traducciones y el documento original, no se requirió la participación de un tercer traductor.

Prueba piloto

Se seleccionaron 11 individuos que cumplían con los siguientes criterios de inclusión: pacientes colombianos, mayores de edad, con diagnóstico de neumonía adquirida en la comunidad leve a moderada (clasificación de Fine) (11), según criterios clínicos y radiológicos, con capacidad para seguir instrucciones sobre el cuestionario y responderlo.

Una vez seleccionados los participantes, se les explicó el estudio y se les entregó la version provisional del cuestionario traducido a español para que lo respondieran (anexo 2, disponible en: doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3025). Posteriormente, se les hizo una entrevista para evaluar cada ítem de forma separada mediante un formato en el que se indagaba sobre la dificultad para entender las preguntas y responderlas, sobre los aspectos confusos o que resultaran ofensivos, y sobre si era necesario plantear la pregunta de forma diferente (anexo 3, disponible en: doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3025).

Por último, se evaluaron las respuestas de los pacientes y sus comentarios sobre cada ítem y se procedió a elaborar el cuestionario definitivo adaptado al español.

La prueba piloto se llevó a cabo en el Hospital de Engativá, hospital público de segundo nivel en el occidente de Bogotá, el cual atiende pacientes de empresas prestadoras de servicios de salud, públicas y privadas. El área de influencia del hospital incluye una población cercana al millón de habitantes.

Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por los comités de ética e investigación del Hospital de Engativá. No se solicitó consentimiento informado individual, dado que se trataba de un estudio sin riesgo y que los participantes respondieron libremente el cuestionario y podían retirarse en cualquier momento.

Resultados

Proceso de traducción directa

Los resultados de la traducción de inglés a español se presentan a continuación.

Pregunta 1

Are you today (XXth day of evaluation) bothered by shortness of breath when:

- *Sitting still* *Yes__/ No__*
- *Walking around the house/Ward.* *Yes __/ No__*
- *Washing/Dressing* *Yes __/ No__*
- *Walking in the street* *Yes __/ No__*

• *Taking a shower* *Yes __/ No__*

• *Walking the stairs* *Yes __/ No__*

En esta pregunta, los traductores coincidieron en cambiar la traducción de *ward*, "sala", por "cuarto de hospitalización". El médico general que colaboró en la traducción sugirió cambiar la traducción literal de *walking the stairs*, "caminando por las escaleras", por "subir las escaleras", y el médico especialista en medicina interna estuvo de acuerdo con la modificación.

Pregunta 2

If you were to give a mark on 1 to 5 scale expressing the severity of your shortness of breath at the moment, which mark would that be:

• *Not at all short of breath (1)* ☐

• *Slightly short of breath (2)* ☐

• *Fairly short of breath (3)* ☐

• *Substantially short of breath (4)* ☐

• *Terribly short of breath (5)* ☐

En esta pregunta el médico general sugirió traducir *fairly* como "ligera", y *slightly* como "muy ligera", cambios que fueron acogidos por el médico internista. En esta pregunta los traductores coincidieron en sustituir la traducción de *terribly* por "intolerable".

Pregunta 3

En esta pregunta los dos traductores coincidieron en cuanto a los términos escogidos y la forma de redacción.

Pregunta 4

When the following statement is correct, please check the leftmost box, the less you agree with the statement, one of the boxes on the right can be ticked off

I feel fit

yes, that is correct

☐ ☐ ☐ ☐ ☐

no, that is not correct.

En esta pregunta los traductores discreparon. El médico internista la tradujo de la siguiente manera: "Si el siguiente enunciado es correcto, por favor, marque la casilla de la izquierda, según su opinión se acerque más a lo contrario, marque las siguientes casillas de la derecha", en tanto que, el médico general la tradujo así: "Cuando el siguiente enunciado sea correcto, por favor, marque el cuadro que esté más hacia la izquierda, entre menos de acuerdo esté con el enunciado, marque el cuadro más hacia la derecha". En la discusión se optó por dejar la segunda traducción, pues se consideró que era más comprensible y ajustada al sentido del documento original.

Pregunta 5

En esta pregunta los dos traductores coincidieron en cuanto a los términos escogidos y la forma de redacción.

Traducción inversa

En la traducción inversa de español a inglés no se encontraron discordancias que hicieran necesaria la revisión de la traducción del cuestionario.

Prueba piloto

La prueba piloto se hizo con un grupo de 11 pacientes, siete mujeres y cuatro hombres, de una edad promedio de 58,6 años; un poco más del tercio de ellos eran bachilleres (cuadro 1). En el momento de responder el cuestionario, todos estaban hospitalizados por neumonía adquirida en la comunidad de leve a moderada según el índice de gravedad de la neumonía, y estaban bajo tratamiento con antibióticos.

Los participantes se demoraron, aproximadamente, cinco minutos en responder el cuestionario y tuvieron dificultades con las siguientes preguntas.

En la pregunta 2, cuatro pacientes refirieron haber tenido dificultades para entenderla e hicieron los siguientes comentarios: "No entendí lo de los números". Uno dijo textualmente: "No la entendí", y otro, "Me confundo entre muy ligera y ligera", sugiriendo cambiar "ligera" por "leve".

En la pregunta 3, literales b, c y d, seis pacientes manifestaron dificultades con las palabras "expectoración" y "esputo", ya que desconocían su

Cuadro 1. Escolaridad de los pacientes que participaron en la prueba piloto

Escolaridad	Número de pacientes	Porcentaje
Ninguna	1	9
Primaria incompleta	2	18,2
Primaria completa	1	9,1
Bachillerato incompleto	2	18,2
Bachillerato completo	4	36,5
Universitario incompleto	1	9
Total	11	100

significado y plantearon cambiar la palabra “esputo” por “flema” y expectorar por “expulsión de flema” o “salida de flema al toser”.

En la pregunta 4, ocho pacientes refirieron no haberla entendido. Uno manifestó desconocer el significado de “en forma” y tres sugirieron cambiarlo por alguna de estas opciones: “¿Cómo se siente hoy?”, “¿Se siente en buen estado físico?”, o utilizar la expresión “forma física”. Cinco pacientes sugirieron cambiar el sistema de cuadros por el de una escala de 1 a 5 que incluyera un espectro de posibilidades entre bueno y muy malo.

Versión definitiva en español

Pregunta 1

Hoy ha tenido (día xx de la evaluación) dificultad para respirar cuando está:

- sentado y quieto Sí__/ No__
- caminando por la casa/ cuarto de hospitalización Sí __/ No__
- aseándose o vistiéndose Sí __/ No__
- caminando en la calle Sí __/ No__
- duchándose Sí __/ No__
- subiendo o bajando escaleras Sí __/ No__

Pregunta 2

Si tuviera que dar un puntaje en una escala de 1 a 5 expresando la gravedad de su dificultad para respirar en este momento, ¿qué puntaje sería?

- Sin dificultad respiratoria alguna (1)
- Dificultad respiratoria muy ligera (2)
- Dificultad respiratoria leve (3)
- Dificultad respiratoria sustancial (4)
- Dificultad respiratoria intolerable (5)

Pregunta 3a

¿Usted tose?

- No (omita las preguntas 3b, 3c y 3d)
- Solo en las mañanas al levantarse
- De vez en cuando a lo largo del día
- Frecuentemente a lo largo del día

Pregunta 3b

¿Expulsa flema al toser? (cantidad de flema en 24 horas)

- No
- Menos de 2 cucharadas
- Más de 2 cucharadas
- Media taza o más

Pregunta 3c

¿Al toser, expulsa la flema con facilidad?

- No tiene molestias con la evacuación de la flema.
- Con facilidad
- Con alguna dificultad
- Con mucha dificultad

Pregunta 3d

¿De qué color es la flema?

- No le ha prestado atención o no tiene flema.
- Transparente
- Blanca
- Verde, amarillo o café.

Pregunta 4

Si tuviera que expresar si se encuentra en buen estado físico, en una escala de 1 a 5, siendo 1 en muy buen estado físico y 5 en muy mal estado físico, ¿cuál número elegiría?

- 1 Muy buen estado físico
- 2 Adecuado estado físico
- 3 Regular estado físico
- 4 Mal estado físico
- 5 Muy mal estado físico

Pregunta 5

Si tuviera que dar un puntaje en una escala de 1 a 5, expresando su estado general de salud en este momento, ¿qué puntaje marcaría?

- Excelente 1__
- Bueno 2__
- Regular 3__
- Malo 4__
- Muy malo 5__

Discusión

Ante la creciente necesidad de optimizar el tratamiento antibiótico en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad, se han creado diversas herramientas para clasificarla. Uno de estos instrumentos es el cuestionario de puntuación de la neumonía adquirida en la comunidad (7),

cuyo objetivo es establecer el momento adecuado para la suspensión del tratamiento antibiótico en pacientes con este tipo de neumonía de leve a moderada. Se sabe que no basta con traducir un instrumento para utilizarlo en otras poblaciones pertenecientes a diferentes culturas, y que es necesario hacer una adaptación transcultural de la herramienta para que realmente sea equivalente a la versión original. En este contexto, en el presente estudio se hizo la adaptación transcultural de dicho cuestionario, elaborado originalmente en inglés, mediante un proceso sistemático y ajustado a las recomendaciones de la ISPOR (9) y la EORTC (10), con el fin de que fuese lingüística y semánticamente equivalente al original.

Durante dicho proceso se hicieron las traducciones directa e inversa sin mayores complicaciones, pues las diferencias entre versiones se resolvieron fácilmente y no hubo necesidad de recurrir a un tercer traductor para conciliar las divergencias, lo cual se explicaría por la simplicidad del cuestionario original y la consecuente facilidad para contestarlo. En la prueba piloto se incluyeron pacientes entre los 20 y 92 años, con una media de edad de 58,6 años; este amplio rango de edades representó una ventaja. Además, las apreciaciones de los pacientes coincidieron en torno a las preguntas que no necesitaron cambios y aquellas que ganarían en claridad al hacer ajustes. Un ejemplo de dichas coincidencias fue el desconocimiento general del significado de las palabras “expectorar” y “esputo”, y la propuesta de cambiarlas por “salida o expulsión de flema” y “flema”, respectivamente. Probablemente, los traductores no consideraron necesario parafrasearlas debido a su entrenamiento médico o a su estrecha relación con el ámbito médico, por lo cual las consideraron como palabras fácilmente entendibles en el lenguaje cotidiano de los pacientes.

Otra de las ventajas del cuestionario en su idioma original que lograron mantenerse fue el tiempo requerido para responderlo. En la prueba piloto los participantes lo respondieron en 5 a 10 minutos, con lo cual se ratificó una de las razones por las cuales se lo escogió para el estudio, su brevedad (solo seis ítems), la cual permite responderlo rápidamente, a diferencia de otros cuestionarios como *The Community-Acquired Pneumonia Symptom Questionnaire*, el cual consta de 18 ítems (12).

Además, debe resaltarse que, comparado con otros cuestionarios como los de Metlay de 1997 (13) y de 1998 (14), y el de Marrie, *et al*. (15), los cuales se restringen a la neumonia leve o, incluso, a pacientes exclusivamente ambulatorios, el cuestionario de puntuación de la neumonía adquirida en la comunidad está diseñado para pacientes con esta condición leve a moderada, lo cual amplía la población objeto del instrumento.

Entre las limitaciones de este estudio debe mencionarse el hecho de haberse restringido a un único centro de atención. Sin embargo, se incluyeron pacientes con diversos niveles de educación, con lo cual se evitó que la futura implementación del cuestionario deba restringirse a una población con un nivel educativo determinado. Otra limitación que pudo haber interferido con las respuestas al cuestionario es que algunos pacientes entrevistados podrían haber tenido algún grado de déficit cognitivo no diagnosticado, o alguna otra condición como disminución de la agudeza auditiva, aunque la coincidencia de los entrevistados en torno a las preguntas que entendieron y aquellas que les plantearon dificultades permitiría concluir que, de existir tales condiciones, tuvieron un efecto menor en el resultado final.

Un aspecto interesante de la discusión sobre las traducciones de un idioma a otro, es que en una región como Latinoamérica la diversidad de matices en la selección de términos implicaría tener que hacer traducciones adaptadas a cada país (Chile comparado con México, por ejemplo). También, podría suponerse lo mismo para las diferentes regiones de Colombia, lo que supondría contar con cuestionarios diferentes para la Costa Atlántica y la zona cafetera. Estas preguntas aún no tienen respuesta. De hecho, no se utilizan cuestionarios diferentes para el inglés británico y el inglés americano. La implementación de los cuestionarios y la realización de otros estudios podrían dar luces sobre las diferentes interpretaciones de una misma pregunta en diversas regiones.

En conclusión, se dispone de una versión en español del cuestionario de puntuación de la neumonía adquirida en la comunidad, producto de un proceso metódico y sistemático, el cual puede seguir validándose para establecer claramente su utilidad en la suspensión temprana del tratamiento antibiótico en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad leve a moderada.

Agradecimientos

Se agradece al Hospital de Engativa, II Nivel, Empresa Social del Estado, por el apoyo en el desarrollo del proyecto.

Conflicto de intereses

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

Financiación

Este proyecto no tuvo financiación directa.

Referencias

1. **Isturiz RE, Luna CM, Ramírez J.** Clinical and economic burden of pneumonia among adults in Latin America. Int J Infect Dis. 2010;14:e852-6. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2010.02.2262
2. **Montúfar FF, Varón FA, Giraldo LF, Sáenz ÓA, Rodríguez A, Alarcón AM, *et al*.** Recomendaciones para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la neumonía adquirida en la comunidad en adultos inmunocompetentes. Infectio. 2013;17(Supl.1):1-38. http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392(13)70019-5
3. **Gobernación de Antioquia, Secretaría Seccional de Salud y Protección Social.** Diez primeras causas de morbilidad por hospitalización, según municipio, sexo y zona. Antioquia 2011. Fecha de consulta: 10 de enero de 2015. Disponible en: http://www.dssa.gov.co/index.php/estadisticas/morbilidad/item/86-morbilidad-ano-2011
4. **Calderón C, Dennis R.** Costos económicos de neumonía adquirida en comunidad, meningitis y bacteriemia por *Streptococcus pneumoniae* en una población adulta que requirió hospitalización en Bogotá, Colombia. Biomédica. 2014;34:92-101. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1553
5. **Nussenblatt V, Avdic E, Cosgrove S.** What is the role of antimicrobial stewardship in improving outcomes of patients with CAP? Infect Dis Clin North Am. 2013;27:211-28. http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2012.11.008
6. **Lim WS, Baudouin SV, George RC, Hill AT, Jamieson C, Le Jeune I, *et al*.** BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: Update 2009. Thorax. 2009;64(Suppl.3):1-55. http://dx.doi.org/10.1136/thx.2009.121434
7. **El Moussaoui R, Opmeer BC, Bossuyt PM, Speelman P, de Borgie CA, Prins JM.** Development and validation of a short questionnaire in community acquired pneumonia. Thorax. 2004;59:591-5. http://dx.doi.org/10.1136/thx.2003.015107
8. **El Moussaoui R, de Borgie CA, van den Broek P, Hustinx WN, Bresser P, van den Berk GE, *et al*.** Effectiveness of discontinuing antibiotic treatment after three days versus eight days in mild to moderate-severe community acquired pneumonia: Randomised, double blind study. BMJ. 2006;332:1355. http://dx.doi.org/10.1136/bmj.332.7554.1355
9. **Wild D, Grove A, Martin M, Eremenco S, McElroy S, Verjee-Lorenz A, *et al*.** Principles of good practice for the translation and cultural adaptation process for Patient-reported Outcomes (PRO) measures: Report of the ISPOR Task Force for Translation and Cultural Adaptation. Value Health. 2005;8:94-104. http://dx.doi.org/10.1111/j.1524-4733.2005.04054.x
10. **Dewolf L, Michael K, Velikova G, Johnson Co, Scott N, Bottomley A.** EORTC Quality of Life Group Translation Procedure. Third edition. Brussels: EORTC; 2009. p. 1-32.
11. **Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, *et al*.** A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. N Engl J Med. 1997;336:243-50. http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199701233360402
12. **Lamping DL, Schroter S, Marquis P, Marrel A, Duprat-Iomon I, Sagnier P.** The community-acquired pneumonia symptom questionnaire: A new, patient-based outcome measure to evaluate symptoms in patients with community-acquired pneumonia. Chest. 2002;122:920-9. http://dx.doi.org/10.1378/chest.122.3.920
13. **Metlay JP, Fine MJ, Schulz R, Marrie TJ, Coley CM, Kapoor WN, *et al*.** Measuring symptomatic and functional recovery in patients with community-acquired pneumonia. J Gen Intern Med. 1997;12:423-30. http://dx.doi.org/10.1046/j.1525-1497.1997.00074.x
14. **Metlay JP, Atlas SJ, Borowsky LH, Singer DE.** Time course of symptom resolution in patients with community-acquired pneumonia. Respir Med. 1998;92:1137-42. http://dx.doi.org/10.1016/S0954-6111(98)90408-5
15. **Marrie TJ, Beecroft MD, Herman-Gnjidic Z.** Resolution of symptoms in patients with community-acquired pneumonia treated on an ambulatory basis. J Infect. 2004;49:302-9. http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2003.11.013

Anexo 1. CAP score questionnaire

Question	Coding
1. Are you today (XXth day of the evaluation) bothered by shortness of breath when	
- sitting still	☐ yes ☐ no
- walking around the house/ward	☐ yes ☐ no
- washing/dressing	☐ yes ☐ no
- walking in the street	☐ yes ☐ no
- taking a shower	☐ yes ☐ no
- walking the stairs	☐ yes ☐ no
2. If you were to give a mark on a 1 to 5 scale expressing the severity of your shortness of breath at the moment, which mark would that be?	
- Not at all short of breath (1)	☐
- Slightly short of breath (2)	☐
- Fairly short of breath (3)	☐
- Substantially short of breath (4)	☐
- Terribly short of breath (5)	☐
3a. Do you cough?	
- No (skip questions 3b, c and d)	☐
- Only in the morning, when getting up	☐
- Now and then, all through the day	☐
- Frequently, all through the day	☐
3b. Do you cough up sputum? (amount of sputum by 24 hrs)	
- No	☐
- Less than 2 spoons	☐
- More than 2 spoons	☐
- Half a cup or more	☐
3c. Do you cough up the sputum with ease?	
- Not bothered by sputum	☐
- With ease	☐
- Fairly difficult	☐
- Very difficult	☐
3d. What is the color of the sputum?	
- Did not pay attention/no sputum	☐
- Transparent	☐
- White	☐
- Green, yellow or brown	☐
4. When the following statement is correct, please check the leftmost box, the less you agree with the statement, one of the boxes on the right can be ticked off	
I feel fit yes, that is correct ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ no, that is not correct	
5. If you were to give a mark on a 1 to 5 scale expressing your general state of health at the moment, which mark would that be?	
- Excellent (1)	☐
- Good (2)	☐
- Fair (3)	☐
- Poor (4)	☐
- Very poor (5)	☐

Anexo 2. Versión provisional de la traducción al español del *CAP score*

1. Hoy ha tenido (día xx de evaluación) dificultad para respirar cuando está:

- sentado y quieto	Sí__/ No__
- caminando por la casa/cuarto de hospitalización.	Sí__/ No__
- bañándose o vistiéndose	Sí__/ No__
- caminando en la calle	Sí _ / No__
- duchándose	Sí__/ No__
- subiendo o bajando escaleras	Sí__/ No__

2. Si tuviera que dar un puntaje en una escala de 1 a 5 expresando la gravedad de su dificultad para respirar en este momento, ¿qué puntaje sería?

- Sin dificultad respiratoria alguna	1__
- Dificultad respiratoria muy ligera	2__
- Ligera dificultad respiratoria	3__
- Dificultad respiratoria sustancial	4__
- Dificultad respiratoria intolerable	5__

3. ¿Usted tose?

- No (omita las preguntas 3b, 3c y 3d)	☐
- Solo en las mañanas al levantarse	☐
- De vez en cuando a lo largo del día	☐
- Frecuentemente a lo largo del día	☐

3a. ¿Expectora al toser? (cantidad de esputo en 24 horas)

- No	☐
- Menos de dos cucharadas	☐
- Más de dos cucharadas	☐
- Media taza o más	☐

3b. ¿Expectora con facilidad?

- No tiene molestias con la expectoración	☐
- Con facilidad	☐
- Con alguna dificultad	☐
- Con mucha dificultad	☐

3c. ¿De qué color es el esputo?

- No le ha prestado atención o no tiene esputo	☐
- Transparente	☐
- Blanco	☐
- Verde, amarillo o café.	☐

4. Cuando el enunciado sea correcto, por favor, marque el cuadrado que esté más a la izquierda, entre menos de acuerdo esté con el enunciado, marque los cuadros hacia la derecha.

Me siento en forma:

Sí, eso es correcto ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ No, eso no es correcto

5. Si tuviera que dar un puntaje en una escala de 1 a 5 expresando su estado general de salud en este momento, ¿qué puntaje marcaría?

- Excelente	1__
- Bueno	2__
- Regular	3__
- Malo	4__
- Muy malo	5__

Anexo 3. Evaluación de las respuestas de los pacientes

Pregunta

a. ¿Le parece que la pregunta es difícil?

- Sí ☐
- No ☐
- Comentarios _____

_____

b. ¿Considera que la pregunta es confusa?

- Sí ☐
- No ☐
- Comentarios _____

_____

c. ¿Existen palabras difíciles que no entiende o desconoce su significado?

- Sí ☐
- No ☐
- Comentarios _____

_____

d. ¿La pregunta es ofensiva o molesta?

- Sí ☐
- No ☐
- Comentarios _____

_____

e. ¿Cómo realizaría usted esta pregunta?

- Comentarios _____

_____

Biomédica 2017;37:111-8
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3006

ARTÍCULO ORIGINAL

Aloinjertos análogos de mucosa bucal en ratas no consanguíneas

Luis González[1], Karla Padrón[1], Siham Salmen[2], Elsy Jerez[3], Lorena Dávila[3], Eduvigis Solórzano[1]

[1] Grupo de Investigaciones en Biopatología, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela
[2] Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela
[3] Cátedra de Periodoncia, Facultad de Odontología, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela

Introducción. A pesar de que existen opciones terapéuticas para el tratamiento de defectos de la mucosa bucal, persiste la necesidad de encontrar sustitutos funcionales, anatómicos y estéticamente similares al tejido que se va a reemplazar, así como soluciones que reduzcan la morbilidad de los injertos autólogos.
Objetivo. Determinar la compatibilidad clínica e histológica de aloinjertos equivalentes de mucosa bucal elaborados mediante ingeniería tisular en ratas no consanguíneas.
Materiales y métodos. Se utilizó una muestra de mucosa bucal de ratas *Sprague Dawley* para la obtención de un cultivo de fibroblastos y otro de queratinocitos y fibroblastos. En ambos casos, se usó una membrana de colágeno comercial como soporte. Después de diez semanas de cultivo, las membranas resultantes se injertaron en cuatro ratas Wistar. La primera fase del estudio consistió en la elaboración de los tejidos análogos de mucosa bucal mediante ingeniería tisular, los cuales se implantaron en ratas Wistar inmunocompetentes; posteriormente, se evaluaron las características clínicas e histológicas del aloinjerto.
Resultados. La evaluación *in vivo* de los tejidos análogos demostró que se habían integrado correctamente en los huéspedes inmunocompetentes, y se había logrado el aumento del biotipo periodontal y la creación de una zona con mayor queratinización. Desde el punto de vista histológico, el tejido adquirió características similares a las de la muestra de mucosa bucal de control, sin ningún tipo de reacción inflamatoria ni signos clínicos o histológicos de rechazo.
Conclusión. Hubo compatibilidad clínica e histológica de los aloinjertos equivalentes de mucosa bucal obtenidos mediante ingeniería tisular.

Palabras clave: aloinjertos; ingeniería de tejidos; técnicas de cultivo de tejidos; mucosa bucal; fibroblastos; queratinocitos.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3006

Oral mucosa analog allografts in non-consanguineous rats

Introduction: Although there are therapeutic options for the treatment of oral mucosa defects, the need for functional, anatomical and aesthetically similar substitutes persists, as well as for solutions to reduce autologous grafts morbidity.
Objective: To determine clinical and histological compatibility of equivalent oral mucosa allografts generated through tissue engineering in non-consanguineous rats.
Materials and methods: We used a sample of oral mucosa from Sprague Dawley rats to obtain a fibroblast culture and a keratinocytes and fibroblasts co-culture. In both cases, we used a commercial collagen membrane as “scaffold”. After ten weeks of culture, we grafted the resulting membranes into four Wistar rats. The first phase of the study was the development of the oral mucosa equivalents generated by tissue engineering. Then, we implanted them in immunocompetent Wistar rats, and finally we evaluated the clinical and histological features of the allografts.
Results: *In vivo* evaluation of mucosal substitutes showed a correct integration of artificial oral mucosa in immunocompetent hosts, with an increase in periodontal biotype and the creation of a zone with increased keratinization. Histologically, the tissue was similar to the control oral mucosa sample with no inflammatory reaction nor clinical or histological rejection signs.
Conclusion: The equivalent oral mucosa allografts generated by tissue engineering showed clinical and histological compatibility.

Key words: Allografts, tissue engineering; tissue culture techniques; mouth mucosa; fibroblasts; keratinocytes.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3006

Contribución de los autores:
Karla Padrón y Siham Salmen: toma de muestras, aislamiento, cultivo y caracterización celular
Luis González, Elsy Jerez, Lorena Dávila: manipulación quirúrgica de los animales y valoración clínica
Eduvigis Solórzano: análisis histológico
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

Varias enfermedades de la cavidad bucal, de origen inflamatorio, traumático, neoplásico o congénito, resultan en defectos de la mucosa bucal (1), entre los cuales cabe mencionar las recesiones gingivales, las vestibuloplastias, el paladar hendido, los traumatismos y la extirpación de tumores (2). Aunque se han propuesto diversos procedimientos quirúrgicos para el tratamiento de estos defectos, persiste la necesidad de encontrar sustitutos funcionales, anatómicos y estéticamente similares al tejido que se va a reemplazar, así como soluciones que reduzcan la morbilidad asociada a la obtención de tejido de zonas donantes, lo cual supone un desafío clínico para los periodoncistas y los cirujanos bucales y maxilofaciales (3).

En este contexto, los recientes avances en medicina, odontología y bioingeniería han abierto la puerta a un nuevo tipo de tratamiento que no requiere la utilización de tejidos autólogos y que se basa en la ingeniería tisular, en la cual se recurre a los principios de la biología y la ingeniería para desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos (1).

Mediante esta técnica, es posible cultivar *in vitro* los queratinocitos y fibroblastos de una mucosa bucal sana, sembrarlos en un soporte y, una vez obtenido el tejido análogo, injertarlo para reconstruir defectos de la mucosa (4), con lo cual disminuiría la duración de las cirugías y se dispondría de más tejido en comparación con otros procedimientos quirúrgicos.

A pesar de esto, son escasos los estudios concluyentes sobre la utilización de aloinjertos como sustitutos eficientes en la reconstrucción de defectos de la mucosa bucal (4), los cuales se proponen como una alternativa novedosa en el campo de la cirugía mucogingival y en la regeneración tisular guiada frente a la morbilidad asociada con otros procedimientos quirúrgicos, a los cuales debe recurrirse dada la poca disponibilidad de materiales de regeneración tisular y de mucosa bucal sana para reemplazar los tejidos lesionados o perdidos (5).

La utilización de aloinjertos análogos de mucosa bucal evitaría el uso de tejido autólogo, con la consecuente reducción de la morbilidad de los tejidos donados, y ofrecería una cantidad considerable de tejido, con lo cual no se necesitarían cirugías múltiples para intervenir áreas mucosas extensas.

La reacción inmunitaria del paciente a los antígenos bucales difiere en algunos aspectos fundamentales de los de otros sitios anatómicos. Las diferencias más llamativas son la gran cantidad de inmunoglobulinas asociadas con los tejidos mucosos, y la tendencia de la inmunización oral con proteínas a inducir la tolerancia de las células T en lugar de su activación, con la consecuente supresión de las reacciones inmunitarias sistémicas humorales y celulares (6).

El objetivo del presente estudio fue determinar la compatibilidad clínica e histológica de aloinjertos análogos de mucosa bucal en ratas no consanguíneas de cepas diferentes, para simular la variabilidad genética entre las especies, y observar su reacción tisular frente al injerto de un solo tipo de células (fibroblastos) y de su cultivo con queratinocitos, con miras a su futura aplicación clínica como posible alternativa terapéutica.

Materiales y métodos

El estudio se desarrolló en tres fases: la primera consistió en la elaboración de los sustitutos de mucosa de ratas *Sprague Dawley* mediante cultivo *in vitro*; en la segunda fase, se procedió a implantar las muestras obtenidas artificialmente en ratas Wistar inmunocompetentes y, en la tercera fase, se evaluaron las características clínicas e histológicas del aloinjerto.

Obtención de la muestra

La muestra para elaborar los injertos análogos de mucosa bucal se obtuvo haciendo una herida de espesor total de 0,5 cm en la mucosa bucal de dos ratas *Sprague Dawley*, específicamente de la encía adherida en la cara vestibular del maxilar superior, en la región ubicada entre los incisivos, anestesiadas con 50 mg/kg de ketamina (Ketamine®) combinada con 10 mg/kg de xilacina (Sedazine®), administradas por vía intraperitoneal, y con lidocaína al 2 % por infiltración. Se hizo una incisión superficial en el tejido y, después, una disección aguda hasta eliminar el tejido mucoso, preservando el periostio.

La muestra se depositó en un tubo estéril de 15 ml que contenía medio Eagle modificado de Dulbecco completo (D-MEM) (D 5546 Sigma-Aldrich), al cual se le adicionaron 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2,5

Correspondencia:
Luis González, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Edificio del Rectorado, Calle 24, entre Avenidas 2 y 3, Mérida (5101), Venezuela
Teléfonos: (0058) (274) 240 2383 y (424) 710 4476
luisgodont@gmail.com

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

mg/ml de trihidrato de anfotericina B: sc-227265 (Santa Cruz Biotecnology, CA), para su posterior procesamiento.

Con el mismo procedimiento se obtuvo la muestra de control de una rata Wistar, la cual se conservó en formol al 10 % para su posterior procesamiento y análisis histológico.

Cultivo primario de queratinocitos y fibroblastos gingivales

Siguiendo el protocolo de Padrón, *et al.* (7), el tejido epitelial se separó del tejido conjuntivo mecánicamente y los dos se disgregaron en una caja de Petri con la ayuda del bisturí; a continuación, se homogeneizaron con el émbolo de una jeringa estéril, con el fin de obtener fragmentos más pequeños de tejido. La muestra se volvió a suspender en medio D-MEM con suplemento de suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich) al 10 % para los queratinocitos y al 20 % para los fibroblastos. En el caso de los fibroblastos, la suspensión celular se sometió a separación por gradiente de densidad, utilizando solución Ficoll-Hypaque con una densidad de 1,077 (Sigma-Aldrich) para eliminar las células mononucleares presentes en el tejido. Después de la centrifugación a 400*g* durante 30 minutos, el botón celular ubicado en el fondo del tubo se recuperó, se lavó tres veces y se sembró en medio D-MEM completo. Los cambios del medio se hicieron cada cuatro días. La viabilidad celular se determinó mediante la técnica de coloración con azul de tripano al 0,4 % y, el fenotipo de los fibroblastos, mediante citometría e inmunofluorescencia directa con el marcador específico de fibroblastos del anticuerpo ER-TR7 sc-73355 PE (Santa Cruz Biotecnology, CA).

Desarrollo de los injertos análogos de mucosa bucal

Transcurridas seis semanas del inicio del cultivo de los fibroblastos, se logró una confluencia de 80 %, aproximadamente; las células en suspensión se separaron de las adherentes, y estas últimas se trataron con tripsina (0,25 %) y ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA); después se las lavó con medio completo y se centrifugaron durante 10 minutos. El botón celular se recuperó, se volvió a someter a suspensión y se sembró sobre una membrana de colágeno bovino de tipo I (Mem-Lok *BiHorizont*®) de uso clínico odontológico.

Después de dos semanas de la siembra de los fibroblastos, la membrana resultante se dividió en dos porciones: una para la continuación del cultivo de fibroblastos y la otra para el de queratinocitos y fibroblastos. Siguiendo el procedimiento previamente descrito para la recuperación de las células, se procedió a sembrar los queratinocitos sobre una de las mitades de la membrana durante dos semanas más, con el fin de obtener un cultivo de mucosa bucal.

Evaluación in vivo de los aloinjertos análogos de mucosa bucal

Se hizo la valoración clínica periodontal de cada uno de los especímenes de la muestra antes del injerto, con base en los siguientes indicadores periodontales: biotipo, color, contorno, consistencia, textura, posición del margen gingival y sondaje vertical utilizando una sonda periodontal de William marcada con milímetros marca *Hu-Friedy*®.

A continuación, los aloinjertos análogos de mucosa bucal se implantaron en colgajos orales en ocho ratas Wistar inmunocompetentes previamente marcadas, de las cuales cuatro se trataron con el colágeno enriquecido con fibroblastos y, las cuatro restantes, con un cultivo de queratinocitos y fibroblastos.

El procedimiento quirúrgico se hizo bajo anestesia (50 mg/kg de ketamina combinada con 10 mg/kg de xilacina por vía intraperitoneal y lidocaína al 2 % por infiltración). Se separó un colgajo de Newman de espesor total utilizando un bisturí Bard Parker con hoja número 15 C y mediante incisiones intracreviculares en la encía adherida en la cara vestibular del maxilar superior (entre los dos incisivos) en cada rata Wistar para la implantación del aloinjerto. En todos los casos, el material injertado se cortó en la cantidad requerida y se inmovilizó mediante puntos simples con sutura no reabsorbible de hilo de seda 4.0. Dicha técnica fue ejecutada por el mismo equipo de cirujanos. Seis semanas después del aloinjerto, se procedió a valorar los injertos con los indicadores periodontales establecidos.

Por último, los animales se sacrificaron mediante una sobredosis inhalada de tiopental (Tiopental®). Después de la eutanasia, se recolectaron las muestras de encía mediante biopsia, se conservaron en formol al 10 % y se incluyeron en parafina para, posteriormente, cortarlas y aplicarles coloración con hematoxilina y eosina, con el fin de hacer el análisis histológico, compararlas con la muestra de mucosa bucal de control y evaluar la presencia o ausencia de infiltrado inflamatorio agudo o crónico, o de células gigantes de reacción a cuerpo extraño, así como la organización del tejido.

Consideraciones éticas

La investigación contó con el aval del Comité de Bioética del Bioterio Central de la Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

Resultados

El tratamiento mecánico y enzimático de estos tejidos demostró ser efectivo en las muestras procesadas, pues se obtuvieron suficientes células en todos los casos. En cuanto a su morfología, con el microscopio óptico de fase invertida, estas células se observaron como elementos esféricos de pequeño tamaño (alrededor de 2 µm de diámetro), que permanecían en suspensión en el medio de cultivo durante las primeras horas de su aislamiento.

En el cultivo primario de fibroblastos y de queratinocitos, se observó la proliferación celular en medio D-MEM con suplemento de suero bovino fetal (SBF) al 20 % y al 10 %, respectivamente. Durante la primera semana, la mayor parte de las células se encontraban adheridas al fondo de la placa de cultivo de manera aislada y habían comenzado a aparecer pequeñas prolongaciones. Se evidenció un crecimiento de fibroblastos y queratinocitos entre la segunda y la tercera semanas, los cuales se agruparon en colonias celulares.

En el caso de los fibroblastos, una trama de células fusiformes se configuró a partir de la cuarta semana, formada por células con largas prolongaciones que ocupaban la superficie de la placa de cultivo. Posteriormente, las colonias fueron aumentando de tamaño hasta obtener una confluencia de aproximadamente 80 % en la quinta semana (figura 1, a-c).

Por su parte, los queratinocitos alcanzaron una confluencia del 80 %, aproximadamente, en la sexta semana. En el análisis con microscopia óptica, se

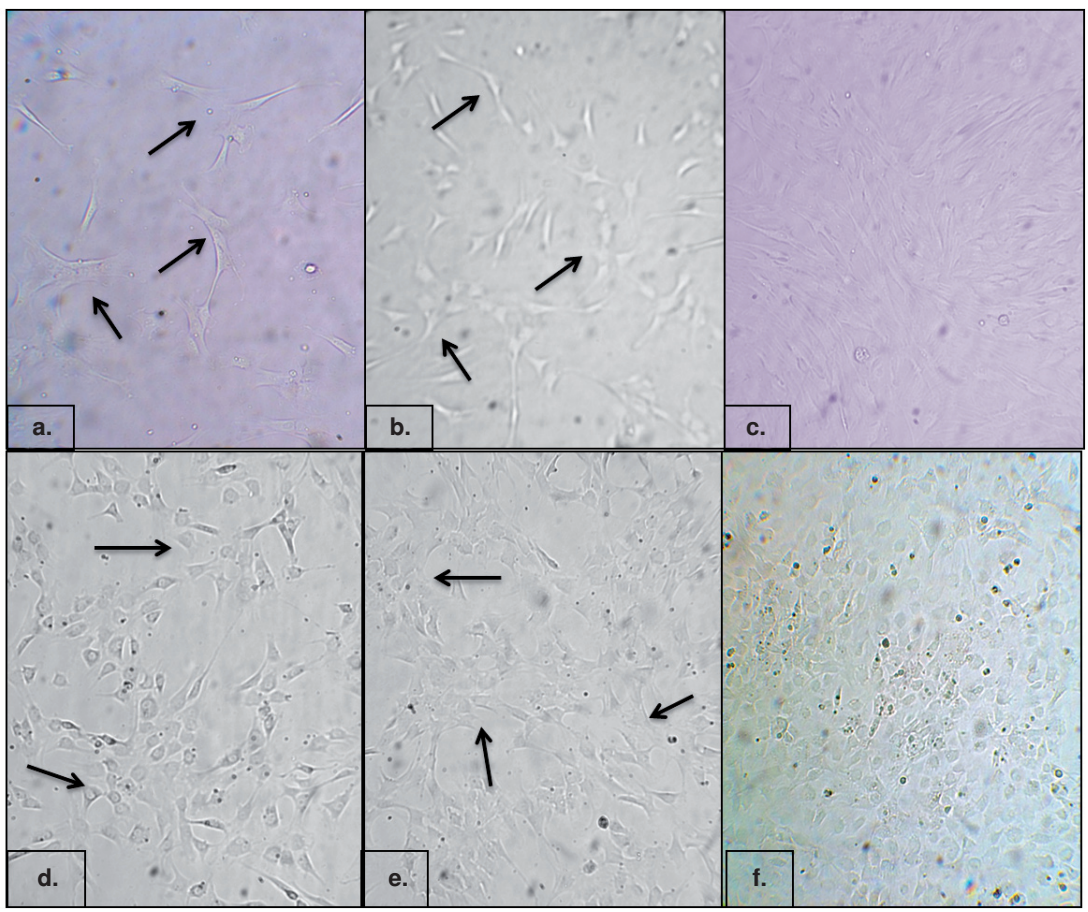


Figura 1. Evolución de los cultivos celulares. **a-c.** Progreso del cultivo de fibroblastos gingivales de rata con medio D-MEM enriquecido con S.F.B al 20 % en la segunda, tercera y cuarta semanas de incubación, respectivamente. **d-f.** Desarrollo del cultivo de queratinocitos gingivales de rata (con medio D-MEM enriquecido con SFB al 10 %) en la segunda, tercera y cuarta semanas de incubación, respectivamente. Las flechas muestran la ubicación de algunas células.

evidenció la existencia de una población celular de queratinocitos configurados en una monocapa en la placa de cultivo, constituida por células irregularmente poliédricas con un núcleo central voluminoso y citoplasma de aspecto hialino (figura 1, d-f).

La elaboración de injertos análogos de mucosa bucal mediante ingeniería tisular se llevó a cabo de manera eficiente. La malla se mantuvo como soporte durante cuatro semanas, tiempo en el cual permaneció inmersa en el medio de cultivo, sin disolverse, lo cual facilitó la proliferación celular.

Debido a su densidad, la membrana no dejó atravesar la luz durante la primera semana de siembra (poco refringente), por lo que fue difícil observar las células, sin embargo, se tornó un poco más porosa a partir de ese momento (figura 2). Los fibroblastos en la periferia permitieron inferir que la superficie semiporosa de la malla permitió la correcta adhesión celular y la subsecuente unión intercelular. Asimismo, se constató la resistencia de la malla Mem-LokBioHorizont®, por lo cual su manipulación fue fácil a la hora del injerto propiamente dicho.

Evaluación in vivo de los injertos análogos de mucosa bucal

En todos los casos, la evaluación de la mucosa bucal de la zona injertada mostró una adecuada integración con el sitio receptor. El procedimiento quirúrgico fue bien tolerado por todos los animales, y no se apreciaron signos clínicos de rechazo o contracción de la cicatriz (figura 3).

En cuanto a la valoración clínica periodontal inicial de los dos grupos, se evidenciaron características normales de la encía como un biotipo delgado, el

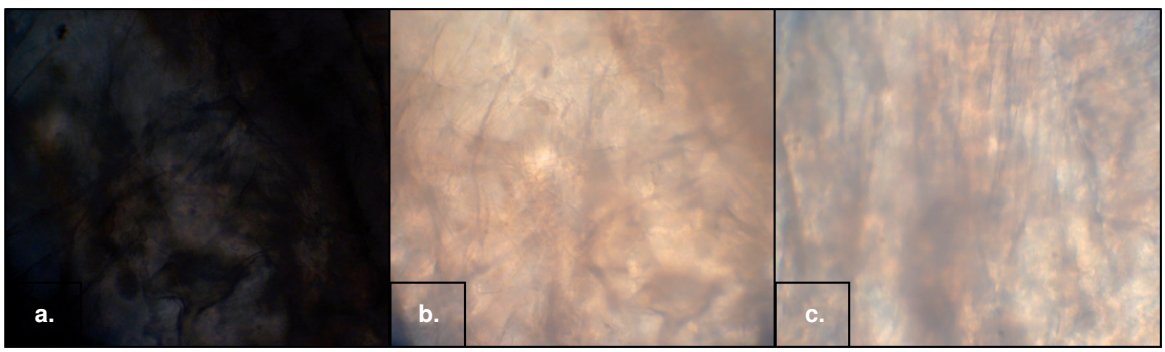


Figura 2. Microfotografía de la membrana de colágeno comercial. **a.** Durante el primer día de siembra. **b.** Al cabo de una semana de la siembra. **c.** A dos semanas de la siembra.

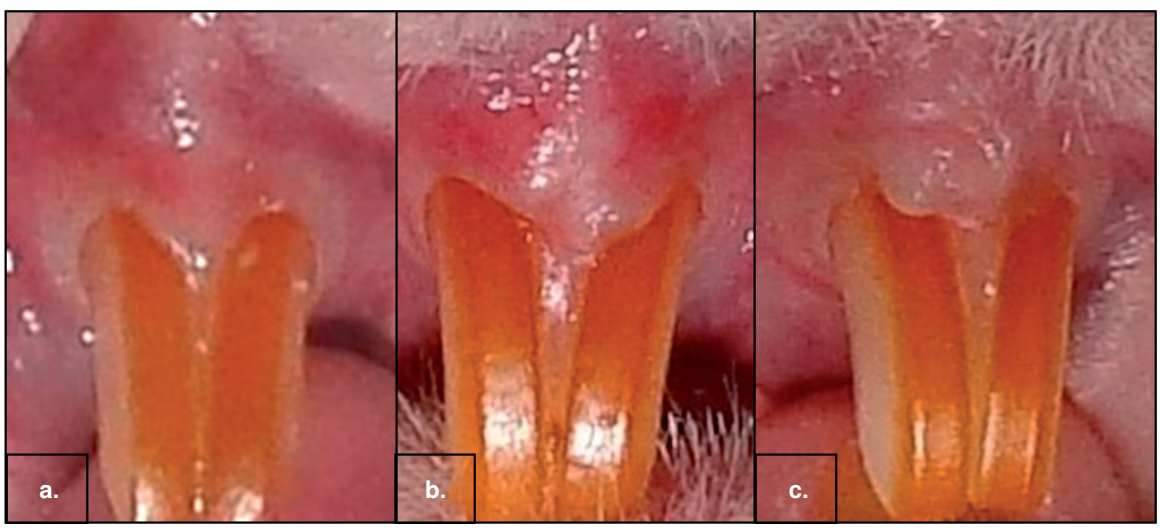


Figura 3. Características clínicas de la mucosa bucal de ratas a las seis semanas del injerto. **a.** Muestra de mucosa de control sin injerto. **b.** Mucosa de una rata *Wistar* con el injerto de fibroblastos cultivados y sembrados sobre soporte de colágeno MEMLOCK. **c.** Injerto de fibroblastos y queratinocitos cultivados y sembrados sobre soporte de colágeno MEMLOCK

color rosado, un contorno festoneado, consistencia firme, textura con el puntillado de cáscara de naranja, posición del margen gingival en el límite amelocementario y un sondaje vertical de 0,5 mm (figura 3a y cuadro 1).

Durante la primera semana del injerto, solo se apreció un ligero eritema en el área; sin embargo, a partir de la segunda semana y en las siguientes evaluaciones, se observó un aumento sostenido del biotipo periodontal (de delgado a grueso), que se evidenció porque el borde de la encía marginal se encontraba más elevado, y la zona injertada más gruesa y con una coloración rosada menos intensa que la mucosa sana circundante, lo cual indicaba una mucosa queratinizada. Los animales que recibieron un injerto combinado con queratinocitos presentaron queratinización más compatible con los patrones normales; en cuanto a las demás características clínicas, estas se mantuvieron dentro de los criterios de normalidad: continuidad con la mucosa adyacente, posición del margen gingival en el límite amelocementario, sondaje vertical de 0,5 mm, textura con el puntillado de cáscara de naranja y consistencia firme, y ausencia de sangrado o contracción de la cicatriz (figura 3, b y c). Estas características se mantuvieron hasta la sexta semana, sin mostrar signos clínicos de rechazo (cuadro 1).

El análisis histológico de las biopsias de encía de los especímenes mostró que, tanto los injertos análogos de mucosa bucal de espesor parcial como los de espesor total, presentaron características similares a las de la muestra de encía de control (figura 4), con una adecuada integración al sitio receptor; se observó una encía tapizada por un epitelio plano estratificado, queratinizado y organizado, de maduración normal. En el corion se observó tejido conjuntivo denso y buena irrigación. En ningún caso se apreció reacción inflamatoria, lo cual indicaba la aceptación del aloinjerto.

Cuadro 1. Indicadores periodontales de los especímenes de la muestra

Rata *Wistar*	Indicador	Biotipo periodontal	Color	Contorno	Consistencia	Textura	Posición del MG	Sondaje vertical (mm)
1 AMBEP	Antes del injerto	Delgado	Rosado	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5
	Después del injerto	Grueso	Rosado Blanquecino	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5
2 AMBEP	Antes del injerto	Delgado	Rosado	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5
	Después del injerto	Grueso	Rosado Blanquecino	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5
3 AMBEP	Antes del al injerto	Delgado	Rosado	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5
	Después del injerto	Grueso	Rosado Blanquecino	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5
4 AMBEP	Antes del injerto	Delgado	Rosado	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5
	Después del injerto	Grueso	Rosado Blanquecino	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5
1 AMBET	Antes del injerto	Delgado	Rosado	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5
	Después del injerto	Grueso	Rosado Blanquecino	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5
2 AMBET	Antes del injerto	Delgado	Rosado	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5
	Después del injerto	Grueso	Rosado Blanquecino	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5
3 AMBET	Antes del injerto	Delgado	Rosado	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5
	Después del injerto	Grueso	Rosado Blanquecino	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5
4 AMBET	Antes del injerto	Delgado	Rosado	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5
	Después del injerto	Grueso	Rosado Blanquecino	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5
Control	----------	Delgado	Rosado	Festoneado	Firme	Puntillado	LAC	0,5

AMBEP: tejido análogo de mucosa bucal de espesor parcial; AMBET: tejido análogo de mucosa bucal de espesor total; MG: margen gingival; LAC: límite amelocementario

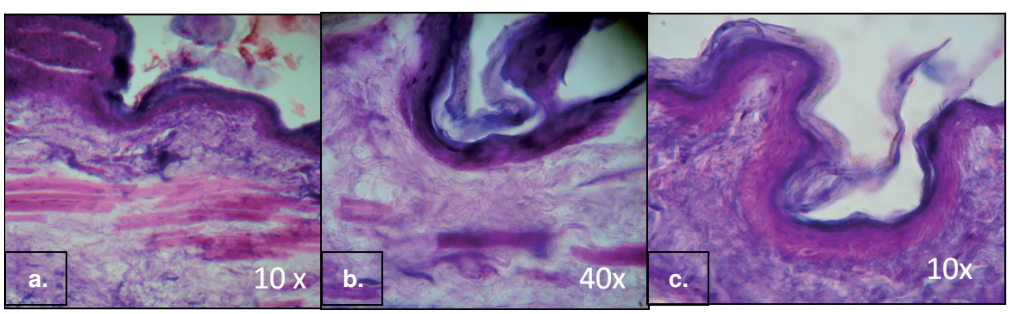


Figura 4. a. Mucosa de una rata *Wistar* de control. **b.** Mucosa de una rata *Wistar* con un injerto de tejido análogo de mucosa oral de espesor parcial. **c.** Mucosa de rata *Wistar* con injerto de tejido análogo de mucosa oral de espesor total

Discusión

La ingeniería tisular permite desarrollar diferentes tejidos artificiales en el laboratorio mediante el uso de células vivas, la manipulación del entorno celular, la creación de sustitutos biológicos y su consecuente implantación en el cuerpo (8). El injerto de sustitutos artificiales de tejidos se perfila como uno de los mejores tratamientos alternativos (9).

Por estar constituida de tejidos blandos con características similares a las de la piel, la mucosa bucal ha servido para el desarrollo de sustitutos artificiales de piel y de la misma mucosa bucal (10,11). Mediante los estudios preclínicos y clínicos de estos productos se han podido proponer nuevos métodos para el tratamiento de heridas de la mucosa bucal de espesor parcial y total (10,12). Se han estudiado varios tipos de sustitutos artificiales de mucosa bucal que, según su estructura y composición, pueden utilizarse para: i) reemplazo del tejido epitelial (13); ii) aumento del tejido conjuntivo presente en la lámina propia cuando hay pérdida o reducción de tejido queratinizado (14); iii) reemplazo total de la lámina propia para favorecer la reparación del tejido conjuntivo y estimular la regeneración del epitelio *in vivo* (15), y iv) reemplazo de mucosa bucal de espesor total con tejidos análogos (16-18).

La metodología desarrollada en la presente investigación permitió el aislamiento y el cultivo de fibroblastos y queratinocitos gingivales a partir de biopsias de mucosa bucal de ratas *Sprague Dawley*, y su posterior utilización para generar equivalentes artificiales de espesor parcial y total sobre un soporte de membrana de colágeno comercial. En otros estudios se han obtenido resultados similares, a pesar de haber empleado una metodología distinta, pues el cultivo de queratinocitos se desarrolló utilizando como soporte una matriz alogénica Alloderm® en un medio exento de factores de crecimiento (19,20). En algunos estudios se han utilizado diversos materiales para la obtención de tejidos en el laboratorio, entre los cuales se destacan los de quitosano, colágeno y fibrina, entre otros (21).

Con la obtención de células epiteliales de mucosa bucal mediante el cultivo de explantes de muestras de este mismo tipo de tejido, en el presente estudio se demostró la gran eficiencia de esta técnica para generar cultivos celulares, tal como se reportó en el estudio de Bayar, *et al.* (22).

La evaluación *in vivo* de los tejidos análogos de mucosa de rata evidenció la adecuada integración de la mucosa bucal artificial en organismos huéspedes (ratas Wistar) inmunocompetentes. Se logró aumentar el biotipo periodontal y crear una zona con mayor queratinización. Desde el punto de vista histológico, el tejido adquirió características similares a las de la muestra de encía de control, con un epitelio plano estratificado y queratinizado de apariencia organizada y maduración normal. En el corion se observó la formación de tejido conjuntivo denso con abundante material eosinofílico, bien irrigado. En ningún caso se detectó reacción inflamatoria.

Estos resultados difieren de los publicados por Junquera, *et al.* (23), en los cuales se reportan tejidos con áreas desestructuradas y degeneración hidrópica, o como los obtenidos por Bello, *et al.* (24), quienes encontraron infiltrado inflamatorio crónico en el injerto de tejido conjuntivo artificial autólogo en conejos.

Los hallazgos permiten inferir que los tejidos análogos de mucosa bucal suministran factores de crecimiento, citocinas y matriz extracelular a las células del huésped (25), y que la porción sin células del aloinjerto (membrana de colágeno), actuaría como un entramado para que las células autólogas migren hacia dentro, lo cual favorece y acelera la formación de epitelio y la curación de la herida en tejidos blandos (16), aumentando la cantidad de mucosa queratinizada, la cual una vez creada o aumentada, puede modificarse y rediseñarse para obtener resultados estéticos y funcionales.

La terapia regenerativa con aloinjertos en la cavidad bucal podría considerarse teóricamente viable, pues debe tenerse en cuenta que la reacción inmunitaria del paciente frente a los antígenos bucales es muy particular y es diferente a la de otros tejidos, especialmente por la gran cantidad de inmunoglobulinas que se produce en asociación con los tejidos mucosos, y la tendencia de la inmunización oral con proteínas a inducir la tolerancia de las células T en lugar de su activación, con la consecuente supresión de las reacciones inmunitarias sistémicas humorales y celulares (6).

El cultivo tisular se proyecta como una posibilidad para la regeneración de tejidos bucales, por lo cual la creación de tejido análogo de mucosa bucal en nuestro laboratorio representa un paso inicial para la implementación de nuevos tratamientos, con el fin de ofrecerles a los pacientes una alternativa en la restitución de tejidos perdidos o dañados, especialmente en la mucosa bucal. Sin embargo, se requieren estudios clínicos para determinar la utilidad de estos tejidos en humanos, aunque se pueden adoptar

otras estrategias iniciales, como la combinación de células alogénicas y autólogas para crear tejidos quiméricos inmunológicamente más aceptables.

Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes, al Instituto de Inmunología Clínica y al Bioterio Central de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Conflicto de intereses

Los autores del presente artículo manifestamos que no tenemos ningún conflicto de intereses con respecto a la información aquí suministrada.

Financiación

Investigación financiada por el CDCHTA de la Universidad de Los Andes, bajo el código O-308-15-03-B.

Referencias

1. **Bello SA, Peña J, Estrada LE, Fontanilla MR.** Sustitutos de mucosa oral creados mediante ingeniería tisular. Una alternativa para la reconstrucción de defectos de mucosa oral. Rev CES Odont. 2001;14:55-64.
2. **Liu J, Bian Z, Kuijpers A, Von J.** Skin and oral mucosa equivalents: Construction and performance. Orthod Craniofac Res. 2010;13:11-20. http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-6343. 2009.01475.x
3. **Marañés C, Liceras E, Alaminos M, Fernández R, Ruiz AM, Garzón I, *et al*.** Generación de un sustituto de mucosa oral humana y comprobación de su viabilidad mediante ingeniería tisular. Cir Pediatr. 2011;24:13-18.
4. **Scheyer ET, Nevins ML, Neiva R, Cochran DL, Giannobile WV, Woo SB, *et al.*** Generation of site-appropriate tissue by a living cellular sheet in the treatment of mucogingival defects. J Periodontol. 2014;85:57-64. http://dx.doi.org/10.1902/jop.2013.130348
5. **Liu J, Mao JJ, Chen L.** Epithelial–mesenchymal interactions as a working concept for oral mucosa regeneration. Tissue Eng Part B Rev. 2011;17:25-31. http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2010.0489
6. **Abbas K, Lichtman A, Pober J.** Inmunología celular y molecular. Segunda edición. Madrid: Interamericana - McGraw Hill; 1995. p. 1181.
7. **Padrón K, Salmen S, Berrueta L, González E, Dávila L, Rojas J, *et al*.** Purificación de fibroblastos gingivales a partir de tejido de la mucosa bucal. Avances en Biomedicina. 2012;1:4-8.
8. **Lenas P, Moos M, Luyten FP.** Developmental engineering: A new paradigm for the design and manufacturing of cell-based products. Part I: From three-dimensional cell growth to biomimetics of *in vivo* development. Tissue Eng Part B Rev. 2009;15:381-94. http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2008.0575
9. **Espinosa L.** Desempeño de sustitutos artificiales de tejido como injertos en heridas de mucosa oral de conejo y evaluación *in vitro* de su papel quimiotáctico. Tesis doctoral. Bogotá, D.C.: Universidad Nacional de Colombia; 2011.
10. **Izumi K, Feinberg SE.** Skin and oral mucosal substitutes. Oral Maxillofac Surg Clin North Am. 2002;14:61-71. http://dx.doi.org/10.1016/S1042-3699(02)00010-9
11. **Raguse JD, Gath HJ.** A metabolically active dermal replacement (Dermagraft) for vestibuloplasty. J Oral Rehabil. 2005;32:337-40. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2842.2004.01430.x
12. **Cañadas LM.** Caracterización histológica de mucosa oral de espesor completo obtenida mediante ingeniería tisular. Tesis doctoral. Granada: Universidad de Granada; 2006.
13. **Tsai CY, Ueda M, Hata K, Horie K, Hibino Y, Sugimura Y, *et al.*** Clinical results of cultured epithelial cell grafting in the oral and maxilofacial region. J Craniomaxillofac Surg. 1997;25:4-8. http://dx.doi.org/10.1016/S1010-5182 (97)80017-0
14. **Thoma DS, Benic GI, Zwahlen M, Hammerle CH, Jung RE.** A systematic review assessing soft tissue augmentation techniques. Clin Oral Implants Res. 2009;20:146-65. http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01784.x
15. **Novaes AB, Marchesan JT, Macedo GO, Palioto DB.** Effect of *in vitro* gingival fibroblast seeding on the *in vivo* incorporation of acellular dermal matrix allografts in dogs. J Periodontol. 2007;78:296-303. http://dx.doi.org/10.1902/jop.2007.060060
16. **Izumi K, Feinberg SE, Iida A, Yoshizawa M.** Intraoral grafting of an *ex vivo* produced oral mucosa equivalent: A preliminary report. Int J Oral Maxillofac Surg. 2003;32:188-97. http://dx.doi.org/10.1054/ijom.2002.0365
17. **Ophof R.**Construction and application of substitutes for oral mucosa in cleft palate repair. Netherlands: Universidad de Nijmegen; 2010.
18. **Garzón IJ.** Estudio de marcadores de diferenciación epitelial en mucosa oral construida por ingeniería tisular. Tesis doctoral. Granada: Universidad de Granada; 2009.
19. **Hotta T, Yokoo S, Terashi H, Komori T.** Clinical and histopathological analysis of healing process of intraoral reconstruction with *ex vivo* produced oral mucosa equivalent. Kobe J Med Sci. 2007;53:1-14.
20. **Song J, Izumi K, Lanigan T, Feinberg SE.** Development and characterization of a canine oral mucosa equivalent in a serum-free environment. J Biomed Mater Res A. 2004;71:143-53. http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.30144
21. **Olávez D, Sosa L, Padrón K, Salmen S, Berrueta L, Dávila L, *et al*.** Análogo de tejido conectivo a partir de fibroblastos gingivales sembrados en membranas de colágeno comercial. Acta Bioclínica. 2013;5:83-97.
22. **Bayar GR, Aydintug YS, Gulses A, Elci P, Sarper M.** A pilot study of the primary culture of the oral mucosa keratinocytes by the direct explant technique. OHDM. 2011;10:88-92.
23. **González S, Junquera L, Peña I, García V, Gallego L, García E, *et al*.** Cultivo *in vitro* con colágeno y fibroblastos humanos de un equivalente de mucosa oral de espesor total. Rev Esp Cir Oral Maxilofac. 2009;31:98-106.
24. **Bello S, Pereira E, Fontanilla M.** Elaboración de tejido conectivo artificial autólogo de mucosa oral y evaluación de su desempeño como cobertura biológica en lesiones mucosas inducidas en conejos. Rev Fed Odontol Colomb. 2004;20:12-28.
25. **González M.** Evaluación de la expresión de factores de crecimiento involucrados en la reparación de heridas mucosas en tejido conectivo artificial. Tesis doctoral. Bogotá, D.C.: Universidad Nacional de Colombia; 2011.

Biomédica 2017;37:119-30
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3225

ARTÍCULO ORIGINAL

Activación de STAT3 por hipoxia en modelos *in vitro* de cáncer de cuello uterino y en células endoteliales

Óscar Ortega, Alejandro Ondo-Méndez, Ruth Garzón

Grupo de Investigación en Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El microambiente tumoral influye en el comportamiento de las células cancerosas. Especialmente, el estímulo de agentes estresantes, como la hipoxia, se convierte en un factor crítico para la evolución y el tratamiento del cáncer. La reacción celular frente a diversos estímulos se manifiesta en la activación de vías de señalización como la JAK/STAT, una de las más importantes por sus efectos en la diferenciación y proliferación celular.
Objetivo. Evaluar el estado de la vía JAK/STAT mediante la expresión o activación de la proteína STAT3 en células de cáncer de cuello uterino (HeLa) y en células endoteliales (EA.hy926) sometidas a hipoxia.
Materiales y métodos. Las líneas celulares se sometieron a condiciones de hipoxia física (1 % de O_2) o química (100 µM de deferoxamina, DFO) durante dos, seis y 24 horas. Mediante *Western blot* se determinó el cambio en la expresión y activación de STAT3, y mediante inmunofluorescencia indirecta, su localización subcelular.
Resultados. La hipoxia se evidenció por la activación y translocación al núcleo del HIF-1. Ni la hipoxia física ni la química alteraron la expresión de STAT3, pero sí la activación, según se comprobó por su fosforilación y su translocación al núcleo en los dos modelos bajo estudio.
Conclusiones. Se evidenció la importancia de la hipoxia como un estímulo que modifica la activación de la proteína STAT3 en las células HeLa y EA.hy926, lo cual la convierte en un elemento importante en el diseño de estrategias terapéuticas contra el cáncer.

Palabras clave: factores de transcripción STAT; hipoxia de la célula; neoplasias del cuello uterino; células endoteliales; microambiente tumoral; células HeLa; estrés fisiológico.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3225

STAT3 activation by hypoxia in *in vitro* models of cervix cancer and endothelial cells

Introduction: The biological behavior of cancer cells is influenced by the tumor microenvironment in which they develop. In this context, stressor stimuli such as hypoxia are considered critical for tumor development and therapeutic management. Cellular response to various stimuli is evidenced in the activation of intracellular signaling pathways such as JAK/STAT, which is one of the most important for its effects in differentiation and cell proliferation.
Objective: To evaluate the condition of the JAK/STAT pathway through the expression/activation of the STAT3 protein in cervix cancer cells (HeLa) and endothelial cells (EA.hy926) subjected to hypoxia.
Material and methods: Cell lines were subjected to physical (1% O_2) or chemical (deferoxamine, DFO, 100 µM) hypoxia for 2, 6 and 24 hours. Changes in the expression and activation of STAT3, and its subcellular localization by indirect immunofluorescence, were determined by western blot.
Results: Hypoxia was evidenced by the activation and translocation to the nucleus of HIF-1. Neither physical nor chemical hypoxia altered STAT3 expression, but it did affect its activation, as seen in its phosphorylation and translocation to the nucleus in the two models under study.
Conclusions: The present study highlights the importance of hypoxia as a stimulus that modifies the activation of the STAT3 protein in HeLa and EA.hy926 cells, which makes it an important factor in the design of therapeutic strategies against cancer.

Key words: STAT transcription factors; cell hypoxia; uterine neoplasms; endothelial cells; tumor microenvironment; HeLa cells; stress, physiological.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3225

Contribución de los autores:
Óscar Ortega: desarrollo de los experimentos
Alejandro Ondo-Méndez: diseño de los experimentos
Ruth Garzón: concepción y diseño del estudio y de los experimentos
Todos los autores participaron en el análisis y la discusión de los resultados, y en la escritura del manuscrito.

El cáncer constituye uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial, y una de las enfermedades de más difícil diagnóstico y tratamiento. A pesar de los grandes avances de las últimas décadas en su comprensión y estudio, su control continúa siendo esquivo (1), en gran medida, debido a que es una enfermedad notablemente compleja en la que un gran número de rutas moleculares y celulares se ven alteradas, lo cual se traduce en múltiples fenotipos (2). En el caso específico del cáncer de cuello uterino, a pesar de la reducción en las tasas de incidencia y mortalidad debido a la implementación de programas de prevención, especialmente en los países en desarrollo, este sigue siendo una de las principales causas de muerte en la población femenina mundial. Aunque se espera que el reporte de casos disminuya con la implementación de la vacunación contra el principal agente causante de la enfermedad, esto no será posible antes de 20 a 30 años. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas y mejores formas de tratamiento sigue siendo válida, más aún cuando la cobertura de la vacuna se restringe a ciertos tipos virales (3).

La comprensión de los mecanismos bioquímicos y genéticos del desarrollo de los tumores es fundamental para detectar, clasificar, vigilar y tratar este tipo de enfermedades, como lo demuestran los nuevos métodos de diagnóstico y los medicamentos basados en moléculas que inhiben o revierten su crecimiento (4).

Entre los factores que afectan el comportamiento biológico de las células cancerosas, los microambientes tumorales han cobrado gran interés. El tejido tumoral es un complejo entramado de células tumorales y de otras no tumorales, entre las cuales se cuentan los fibroblastos del estroma, los adipocitos, las células del sistema inmunológico como macrófagos y neutrófilos, y las células del endotelio de los vasos sanguíneos. Además de las condiciones ambientales que cumplen funciones críticas para el desarrollo del fenotipo tumoral, existen otros factores biológicos, químicos y físicos, como las moléculas de la matriz extracelular, así como las condiciones ambientales de oxigenación, la presión intersticial y el pH, que afectan el comportamiento tumoral (5).

Uno de los factores críticos de la viabilidad de las células tumorales y de las adyacentes al tumor, son las concentraciones tisulares de oxígeno (6). Dado que solo un número limitado de células puede recibirlo por difusión directa a partir de un vaso sanguíneo (60-100 µm por vaso), estas sufren condiciones de estrés metabólico como la hipoxia y la falta de nutrientes, las cuales hacen evidente la heterogeneidad tumoral (7). En el tejido tumoral la tasa de consumo de oxígeno de las células neoplásicas y del estroma excede su disponibilidad, ya de por sí limitada, lo que resulta en áreas con concentraciones de oxígeno inferiores al 5 % (8), con la consecuente alteración en la expresión génica y proteica en estos tejidos (9).

Hay información que evidencia la asociación de la hipoxia tumoral con los resultados clínicos desfavorables en el carcinoma de cuello uterino, y con la resistencia a la radioterapia y la quimioterapia. En varios estudios se ha reportado el aumento de marcadores metabólicos relacionados con la hipoxia, como el lactato, el transportador de glucosa (Glut1) y la anhidrasa carbónica (CAXIV), todos ellos relacionados con la actividad de transcripción del factor inducible por hipoxia, HIF-1α (10).

Las rutas de señalización celular determinan la forma en que la célula incorpora los estímulos del medio ambiente, y reacciona frente a estos mediante diferentes tipos de modificaciones en su expresión génica y en la regulación de la actividad enzimática. La vía JAK/STAT ha demostrado tener un importante papel entre las rutas de señalización implicadas en este proceso; las proteínas que hacen parte de esta vía son capaces de detectar una gran variedad de señales del entorno y hacer su transducción al núcleo, lo cual afecta directamente la regulación de la expresión génica (11). Mientras la activación de estas proteínas es rápida, el tiempo en que permanecen activas es reducido debido a mecanismos específicos de realimentación negativa. La activación aberrante y sostenida de esta vía se ha asociado con múltiples condiciones, como la inflamación crónica, las reacciones inmunitarias anormales o el cáncer (12). Aunque no se han observado mutaciones en los genes que codifican para las proteínas de la familia STAT en el cáncer, sí se ha encontrado su activación persistente y aberrante en diversos tipos de cánceres humanos (13).

Correspondencia:
Ruth Garzón, Grupo de Investigación en Bioquímica y Biotecnología, Universidad del Rosario, Carrera 24 N° 63C-69, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 297 0200, extensión 4043
ruth.garzon@urosario.edu.co

Recibido: 25/01/16; aceptado: 16/06/16

En el cáncer de cuello uterino se ha reportado la expresión exagerada y la activación constitutiva de la vía, especialmente mediante la proteína STAT3, tanto en biopsias de pacientes (14) como en estudios *in vitro* con células de carcinoma de cuello uterino, como las HeLa (15), C33a, SiHa y CaSki (16). Se ha sugerido que esta activación aberrante tiene un papel prominente en el desarrollo y la progresión de la enfermedad, y se la ha relacionado con el mal pronóstico y la poca supervivencia de los pacientes; sin embargo, los mecanismos que la explican no se han aclarado completamente.

A partir de los resultados reportados se puede inferir que existen otras vías de señalización o condiciones ambientales que afectan su activación. De hecho, diversos factores, como el estrés mecánico o el oxidativo, se han relacionado con la activación no canónica de esta vía (17), y en varios estudios se ha sugerido que la adaptación a las condiciones de hipoxia en varias líneas tumorales estaría asociada a la estimulación de la vía JAK/STAT, hecho que la convierte en un factor crítico en el desarrollo, la supervivencia y la expansión de las células malignas (18). Sin embargo, a diferencia de otras vías de señalización oncogénicas, esta no se ha explorado completamente en condiciones de hipoxia, por lo cual la importancia de su activación podría estar subestimada. Por ello, resulta de gran interés ahondar en la comprensión de los factores que conducen a su activación aberrante y su efecto en el proceso de oncogénesis y desarrollo tumoral (19).

De las siete proteínas de la familia STAT, la STAT3 y la STAT5 han sido las más ampliamente vinculadas a procesos de desarrollo tumoral (20). La STAT3 es una oncoproteína que se encuentra activa de manera constitutiva en cerca del 70 % de los tumores sólidos y hematológicos, incluidos el mieloma múltiple, varios tipos de linfoma y leucemia, el cáncer de seno, cabeza y cuello, el cáncer de próstata, el carcinoma de ovario, el melanoma, el carcinoma renal, el colorrectal y los tumores del epitelio del timo (21). Aunque existen formas mutantes constitutivamente activas disponibles para la investigación, como la STAT3C, la aparición de estas formas es extremadamente rara en cultivos *in vitro* (22).

Se ha observado que las células obtenidas a partir de tejidos tumorales que muestran activación constitutiva de STAT3 *in vivo* pierden rápidamente la fosforilación una vez se ponen en cultivo sin células del estroma o del sistema inmunológico (23), lo cual lleva a plantear que, a menudo, la activación de STAT3 en el cáncer es el resultado de la estimulación crónica producida por los estímulos extracelulares presentes en el microambiente tumoral, como la hipoxia, la presencia de diversas citocinas o factores de crecimiento (24),o de células sanas adyacentes como las del sistema inmunológico o las del tejido endotelial responsable de la creación de nuevos vasos sanguíneos (25).

En algunos estudios se ha reportado la asociación de las STAT3 con la adaptación de las células tumorales a condiciones de hipoxia cuando interactúan físicamente con el HIF-1α y activan la transcripción completa de genes regulados por este factor (26). Esta adaptación se relaciona con el cambio metabólico dependiente de las condiciones de oxígeno en las células sanas y en las transformadas (27).

Entre los componentes del microambiente tumoral, el tejido endotelial ha cobrado especial interés por su amplia relación con el desarrollo y el crecimiento de los tumores de cuello uterino, no solo porque facilita el acceso del oxígeno mediante la angiogénesis, sino por la secreción de citocinas y factores de crecimiento que promueven el desarrollo del neoplasma de cuello uterino. En la activación de estos procesos, se ha evidenciado el papel protagónico de la proteína STAT3 en las células tumorales y en las del tejido endotelial adyacente durante la reacción a los estímulos autocrinos y paracrinos de estos tipos celulares (10,28).

El conocimiento sobre el estado de los diferentes procesos en los tipos celulares que componen el microambiente, en especial de las vías de señalización que los hacen posibles, es de gran relevancia en la interpretación de la reacción de las células tumorales a los estímulos externos, sobre todo a las condiciones cambiantes de las concentraciones de oxígeno.

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el estado de expresión o activación de la vía de señalización JAK/STAT en dos modelos *in vitro*, uno endotelial y otro tumoral, sometidos a condiciones de hipoxia semejantes a las encontradas en el microambiente tumoral.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Para la recreación *in vitro* de los componentes del microambiente tumoral, se escogió como modelo la línea celular HeLa (adenocarcinoma de cuello

uterino humano) y, como modelo de las células adyacentes sanas, la línea endotelial EA.hy926 (línea endotelial humana fusionada con la línea A549 de carcinoma de pulmón). Las células se cultivaron en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), con suplemento de suero fetal bovino (SFB) al 10 %, en atmosfera húmeda, con 5 % de CO_2 y a 37 °C.

Condiciones de hipoxia

La hipoxia física se logró mediante una cámara aislada C-Chamber de BioSpherix® y un controlador de la concentración de oxígeno y dióxido de carbono ProOx C-21 de BioSpherix®, con una composición de gases de 1 % de O_2 y 5 % de CO_2, equilibrado con N_2 al 99,9 %, a 37 °C (29). La hipoxia química se consiguió mediante la adición de 100 µM de mesilato de deferoxamina (DFO, Sigma) (29,30). Las células se mantuvieron en estas condiciones de cultivo durante todos los experimentos.

Ensayo de citotoxicidad mediante el ensayo de MTT

Se sembraron, aproximadamente, 25.000 células en cajas de cultivo celular de 96 pozos y se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO_2 para permitir su adherencia. Posteriormente, los cultivos se sometieron a condiciones de normoxia, hipoxia física (1 % de O_2) e hipoxia química (100 µM de DFO), durante dos, seis y 24 horas. Al finalizar este periodo, se descartó el medio y se agregaron 100 µl de medio DMEM sin suero con MTT a una concentración de 1 mg/ml (Invitrogen), se dejó en incubación durante cuatro horas a 37 °C y 5 % de CO_2. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 µl de isopropanol y 0,05 de solución normal de ácido clorhídrico para permitir la disolución de los cristales de formazán, luego se dejó en incubación durante una hora a temperatura ambiente y en agitación sobre una plataforma balanceante y, finalmente, se hizo la lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

Extracción de proteínas totales

Después de los diferentes estímulos, las células se lavaron tres veces con solución tampón fosfato salino (PBS) y se les adicionaron 500 µl de solución tampón: 50 mM de TrisCl, pH 7,4; 15 mM de cloruro de sodio (NaCl); 5 mM de EDTA, y Triton™ X-100 al 0,5 % (RIPA) (Sigma) con suplemento de 5 µl/ml de una mezcla de inhibidor de proteasas (AEBSF, aprotinina, bestatina, E-64, leupeptina y pepstatina A) (Sigma), 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma) y 1 mM de ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) (Sigma). Los cultivos celulares se cosecharon utilizando un raspador de células; la suspensión se recolectó y se sometió a lisis con solución tampón RIPA utilizando una jeringa con aguja de calibre 21, se incubó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó durante otros 15 a 14.000 rpm a 4 °C. El sobrenadante con las proteínas se recolectó y almacenó a -80 °C para su posterior uso.

Extracción de proteínas nucleares

Para la extracción de las proteínas nucleares, se empleó el estuche Nuclear Extract Kit® (Active Motif). Las células con confluencia del 95 % se lavaron con PBS e inhibidor de fosfatasas, se les añadieron 500 µl de solución tampón hipotónica y se las incubó durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, se agregaron 25 µl de detergente y se mezcló en un agitador durante 10 segundos. La suspensión se centrifugó durante 30 segundos a 14.000 rpm y a 4 °C, y el sobrenadante con las proteínas citoplasmáticas se transfirió a un tubo Eppendorf y almacenó a -80 °C.

El material sedimentado resultante, correspondiente a la fracción nuclear enriquecida, se suspendió de nuevo en solución tampón de lisis que contenía 1 mM de ditiotreitol (DTT) y la mezcla de inhibición de proteasas. La suspensión se incubó durante 30 minutos sobre hielo en plataforma balanceante y, posteriormente, se homogeneizó en un agitador durante 30 segundos. Se centrifugó durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante con las proteínas nucleares se almacenó en varias alícuotas a -80 °C hasta su uso. Las proteínas se cuantificaron mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (Thermo), según las instrucciones del fabricante. La pureza de las proteínas nucleares se verificó por *Western blot*, utilizando anticuerpos contra lámina A (proteínas nucleares) y actina beta (proteínas citoplásmicas).

Activación del factor de transcripción HIF-1α

La activación del factor de transcripción HIF-1α se comprobó utilizando el sistema TransAM™ HIF-1 (Active Motif). Para el ensayo se utilizaron 10 µg de extractos nucleares por pozo y se incubaron con la secuencia correspondiente al elemento de respuesta a la hipoxia (ERH) provista en el estuche, según las instrucciones del fabricante. La actividad del HIF-1 presente en los extractos nucleares se comprobó mediante lecturas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm y 655 nm.

Detección de proteínas mediante Western blot

La separación de las proteínas se hizo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 8 %. Se utilizaron 40 µg de proteína por pozo. Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 96 °C, se centrifugaron a 14.000 rpm a 4 °C durante cinco minutos y se sembraron en cada uno de los pozos.

La electroforesis se hizo durante dos horas a un voltaje constante de 120 V y las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare), utilizando el sistema de transferencia húmeda Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) en solución tampón de transferencia (15 mM de tris, 120 mM de glicina, metanol al 15 %) (Merck) a 100 V durante dos horas.

Las membranas se mantuvieron en solución salina amortiguadora TBS con Tween-20 (TBS-T) (20 mM de tris con pH de 7,6; 137 mM de NaCl, Tween® 20 al 0,1 %) (Sigma), hasta su uso. Posteriormente, se bloquearon durante dos horas con leche descremada al 5 % en TBS-T para STAT3 o con albúmina de suero bovino (BSA) al 1 % en TBS-T para actina beta, y se incubaron toda la noche a 4 °C con anti-STAT3 en una proporción de 1:500 (STAT3 (C-20), Santa Cruz Bioctechnology) diluido en leche descremada al 5 % o con el anticuerpo primario monoclonal producido en ratón anti-actina beta en proporción de 1:5.000 para el control de carga (Sigma). Se lavaron tres veces con TBS-T en agitación durante 10 minutos cada vez y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado en peroxidasa de rábano (HRP), durante dos horas a temperatura ambiente y en agitación continua.

Las proteínas se detectaron con quimioluminiscencia acentuada (ECL Plus) (GE Healthcare) y se documentó mediante películas de alto rendimiento para quimioluminiscencia (GE Healthcare). Las películas se digitalizaron a una resolución de 600 dpi y se analizaron por densitometría con el programa de análisis de imágenes Image J, versión 1.44.

Inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en tirosinas

Se utilizaron perlas de proteína G sefarosa (Sigma), las cuales se lavaron inicialmente tres veces con 500 µl de PBS y 5 µl/ml de la mezcla de inhibidores de proteasas, 1mM de PMSF y 1 mM de Na_3VO_4, y se centrifugaron en cada lavado a 14.000 rpm durante un minuto.

Para formar el complejo de anticuerpo y polisacárido, se utilizaron 70 µl de perlas a las cuales se le añadió el anticuerpo antifosfotirosina (Millipore) en una concentración de 0,03 µg/µl y se incubaron toda la noche a 4°C en agitación constante. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante un minuto y se retiró el exceso de anticuerpos presente en el sobrenadante.

Se hicieron tres lavados con PBS e inhibidores de proteasas y fosfatasas, se agregaron 500 µg de proteínas totales y se llevaron a un volumen de 500 µl con PBS e inhibidores de proteasas y fosfatasas; después, se incubaron a 4 °C durante dos horas en agitación constante y se lavaron tres veces en las condiciones ya descritas. Las perlas se suspendieron de nuevo en 60 µl de solución tampón de carga 4X para SDS-PAGE, y se calentaron a 96 °C para permitir la disociación de las proteínas de interés del complejo de anticuerpo y polisacárido. La muestra se centrifugó durante cinco minutos a 14.000 rpm y 4 °C, y el sobrenadante se recolectó y se sometió a electroforesis mediante *Western blot* como se describió anteriormente.

Inmunocitoquímica con anticuerpos inmunofluorescentes

Las células se sembraron sobre cubreobjetos dispuestos en cajas de cultivo celular de 24 pozos, en una densidad de 30.000 células por pozo con 500 µl de medio DMEM y 10 % de suplemento de suero fetal bovino (SFB), y se cultivaron durante 24 horas para permitir su adherencia. Posteriormente, se lavaron tres veces con PBS, y las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % (PFA, Sigma) durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación continua. Después, se retiró el PFA y se hicieron otros tres lavados con PBS a temperatura ambiente.

Las células se hicieron permeables con 0,3 % de Triton™ X100 (Sigma) en PBS durante cinco minutos a temperatura ambiente y en agitación constante. Se lavaron de nuevo tres veces con PBS y se incubaron con 50 mM de cloruro de amonio (NH_4Cl) fresco para evitar la autofluorescencia de los grupos aldehído por la fijación con PFA.

A continuación, las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con solución tampón de bloqueo (1 % de BSA en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubó con anticuerpo anti-STAT3 diluido en solución tampón de bloqueo a una concentración de 1:100 durante toda la noche a 4 °C; se hicieron seis lavados con PBS y se incubaron durante dos horas con el anticuerpo

secundario Alexa Fluor® 568 Goat Anti-RabbitIgG (Life Technologies) en dilución de 1:1000 en solución tampón de bloqueo.

Para la detección de los núcleos, se hicieron tres lavados adicionales, se tiñó con 0,2 µg/ml de colorante Hoechst 33342 (LifeTechnologies) y se incubó durante 30 minutos.

Por último, los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS y se fijaron sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje Fluoromount (Sigma). Para cuantificar la translocación de la proteína al núcleo, se utilizó un microscopio de fluorescencia y se contabilizó en 100 células la incorporación de proteína STAT3 al núcleo utilizando el programa ImageJ (versión 1.44).

Análisis estadístico

Los experimentos se hicieron por triplicado y los datos obtenidos se expresaron como promedios y su desviación estándar. Se hicieron pruebas t para medias de dos muestras pareadas, con el fin de determinar las diferencias estadísticamente significativas en las condiciones de hipoxia comparadas con las de normoxia. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa Graph Pad Prism (v. 6, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

Resultados

Inducción de hipoxia y activación de HIF-1

Las condiciones de hipoxia física y química se comprobaron mediante la activación de HIF-1 y su migración al núcleo en extractos nucleares de células HeLa y EA.hy926. La absorbancia obtenida permitió ratificar que los cultivos celulares expuestos a condiciones de hipoxia física con concentraciones de oxigeno del 1 % y de hipoxia química utilizando100 µM de DFO presentaron concentraciones más altas de HIF-1 en el núcleo, comparados con las células en condiciones de normoxia (figura 1).

La hipoxia física activó el HIF-1 tempranamente, a partir de las dos horas, con una ligera tendencia a disminuir a las 24 horas, en tanto que su activación tras la exposición a la hipoxia química se inició a las dos horas y continuó en aumento durante el experimento. Se observó, además, un incremento más pronunciado de HIF-1 en las células HeLa y ligeramente mayor bajo condiciones de hipoxia química en las dos líneas celulares.

La determinación de la activación del HIF-1 permitió confirmar que las concentraciones de oxígeno de 1 % y las utilizadas con el agente quelante del hierro, DFO, inducían las condiciones de estrés celular, y sus valores registraron diferencias estadísticamente significativas al compararlos con los obtenidos en condiciones de normoxia. Dichas condiciones de hipoxia, excepto a las 24 horas de hipoxia física en las células HeLa ($p<0,05$), no tuvieron efectos citotóxicos para las células HeLa y EA.hy926 en los periodos analizados (no se presentan los datos).

La hipoxia no modificó la expresión constitutiva de STAT3 en las células HeLa y EA.hy926.

Para valorar la expresión de STAT3 con respecto al tipo y la duración del evento estresante, las células se sometieron a un ambiente de 1 % de O_2 durante dos, seis y 24 horas. Después de aplicar el estímulo, no se registró ningún cambio en la expresión constitutiva de la proteína STAT3

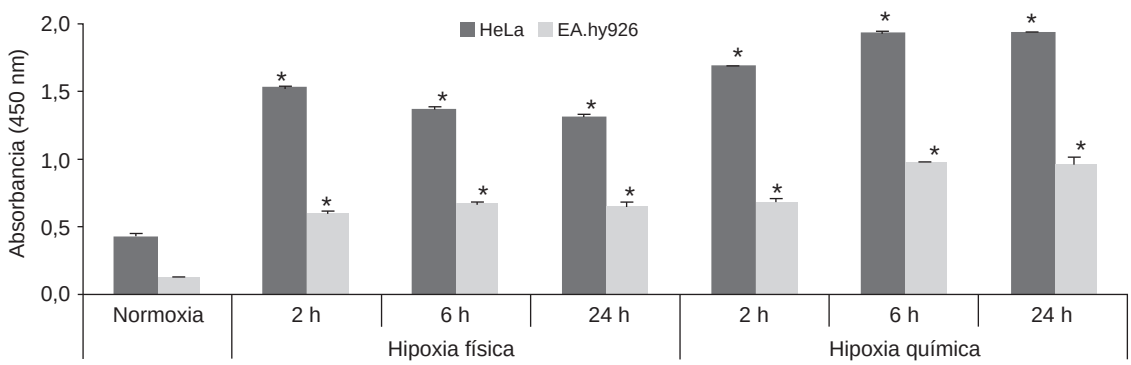


Figura 1. Activación de HIF-1 en células HeLa y EA.hy926 bajo condiciones de hipoxia física y química. Para la hipoxia física las células se sometieron a concentraciones de O_2 de 1 % y para la hipoxia química se utilizaron 100 µM de DFO. Se extrajeron las proteínas nucleares, y el HIF-1 se detectó por ELISA con el *kit* TransAM™. Se hizo la prueba t para medias de dos muestras pareadas entre el control en condiciones de normoxia y cada una de las condiciones de experimentación.
*: $p<0,05$

de la línea tumoral HeLa ni de la línea endotelial EA.hy926 en condiciones de normoxia e hipoxia, siendo mayor la expresión de STAT3 en las células endoteliales (figura 2).

La hipoxia indujo la activación de STAT3 en las líneas HeLa y EA.hy926.

La inmunoprecitación de las proteínas fosforiladas permitió establecer que la hipoxia física indujo cambios en la activación de la proteína STAT3 de las dos líneas celulares estudiadas. En las células HeLa se observó fosforilación de STAT3 a partir de las seis horas del estímulo, mientras que, en las células EA.hy926, la fosforilación se detectó a las dos horas. Se confirmó que bajo las mismas condiciones no hubo cambio en la expresión de la proteína total STAT3. El análisis por densidad óptica relativa evidenció un incremento progresivo de la forma fosforilada de la proteína STAT3, es decir, su forma activa, dependiente del tiempo (figura 2).

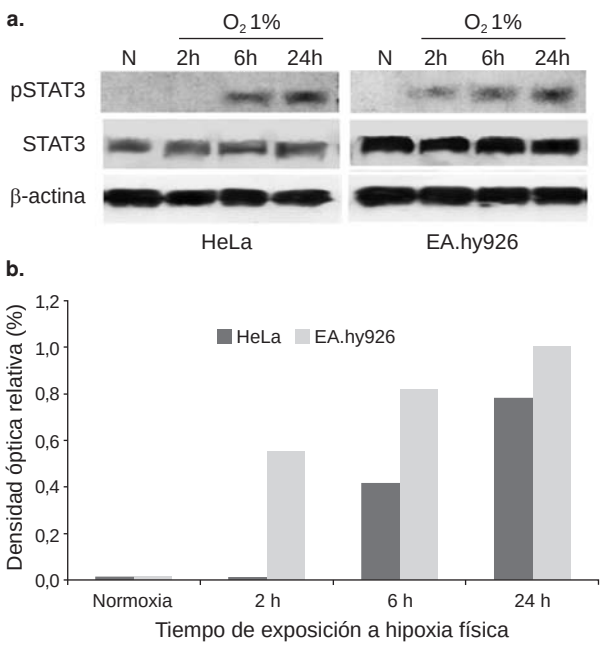


Figura 2. Inmunodetección de STAT3 fosforilada en células HeLa y EA.hy926 expuestas a hipoxia física. **a.** Activación de STAT3 en células HeLa y EA.hy926 expuestas a hipoxia física. Para la detección de pSTAT3 en cada una de las muestras, se inmunoprecipitaron 500 µg de extractos totales con proteína G-sefarosa y anti-fosfotirosina, clon PY20, y posteriormente se hizo la inmunodetección mediante *Western blot* con anti-STAT3. **b.** Densidad óptica relativa de la forma fosforilada de STAT3 en células HeLa y EA.hy926 expuestas a hipoxia física. Los resultados obtenidos en la inmunodetección de pSTAT3 se escanearon y procesaron con el programa ImageJ, Version 1.44. Los resultados obtenidos se normalizaron con base en la expresión de STAT.

La activación de STAT3 por hipoxia física se confirmó mediante inmunocitoquímica usando anticuerpos fluorescentes. En las células HeLa, la translocación nuclear de STAT3 se observó con una intensidad moderada a las dos horas y con mayor intensidad a las seis y 24 horas. En las células EA.hy926, la translocación de STAT3 se inició tempranamente, desde las dos horas, con un pico de mayor intensidad a las seis horas, y permaneció de forma más leve hasta las 24 horas. La translocación nuclear de STAT3 no fue tan evidente bajo condiciones de hipoxia química con 100 µM de DFO en las células HeLa y EA.hy926 en los tiempos de estudio. Los resultados fueron compatibles con el porcentaje de células con translocación nuclear de STAT3, y se encontró una diferencia significativa entre la hipoxia química y la hipoxia física en todas las condiciones analizadas (figura 3).

Los resultados de la inmunofluorescencia indirecta permitieron confirmar la translocación nuclear de la proteína tras el estímulo con hipoxia física en las células HeLa y EA.hy926. Resulta interesante que la translocación nuclear fuera menos acentuada en condiciones de hipoxia química con DFO, aunque siguió mostrando diferencias significativas con respecto a su control en condiciones de normoxia ($p<0,05$).

Discusión

Los microambientes tumorales y su reacción ante diferentes estímulos estresantes y agentes terapéuticos han cobrado una gran importancia en la comprensión del desarrollo del tumor (31). Frente a un estímulo ambiental como la hipoxia, las células reaccionan con diversos mecanismos de adaptación, que incluyen la activación de rutas de señalización implicadas en la proliferación, la angiogénesis y la regulación metabólica.

El papel del HIF-1α en condiciones de hipoxia se ha considerado crítico para iniciar la respuesta celular en tales situaciones (32), lo que podría estar relacionado con la activación de otras vías de señalización que buscan que la célula se adapte a las condiciones cambiantes de su ambiente. Las condiciones de hipoxia establecidas en el estudio se comprobaron al evaluar la activación del HIF-1 por su unión a la secuencia de ADN correspondiente al elemento de respuesta a la hipoxia, tanto física como química. Las condiciones de hipoxia física y de hipoxia química no desencadenaron efectos citotóxicos para las células en estudio, lo que concuerda con estudios anteriores en los que estos efectos se han descrito después de exposiciones

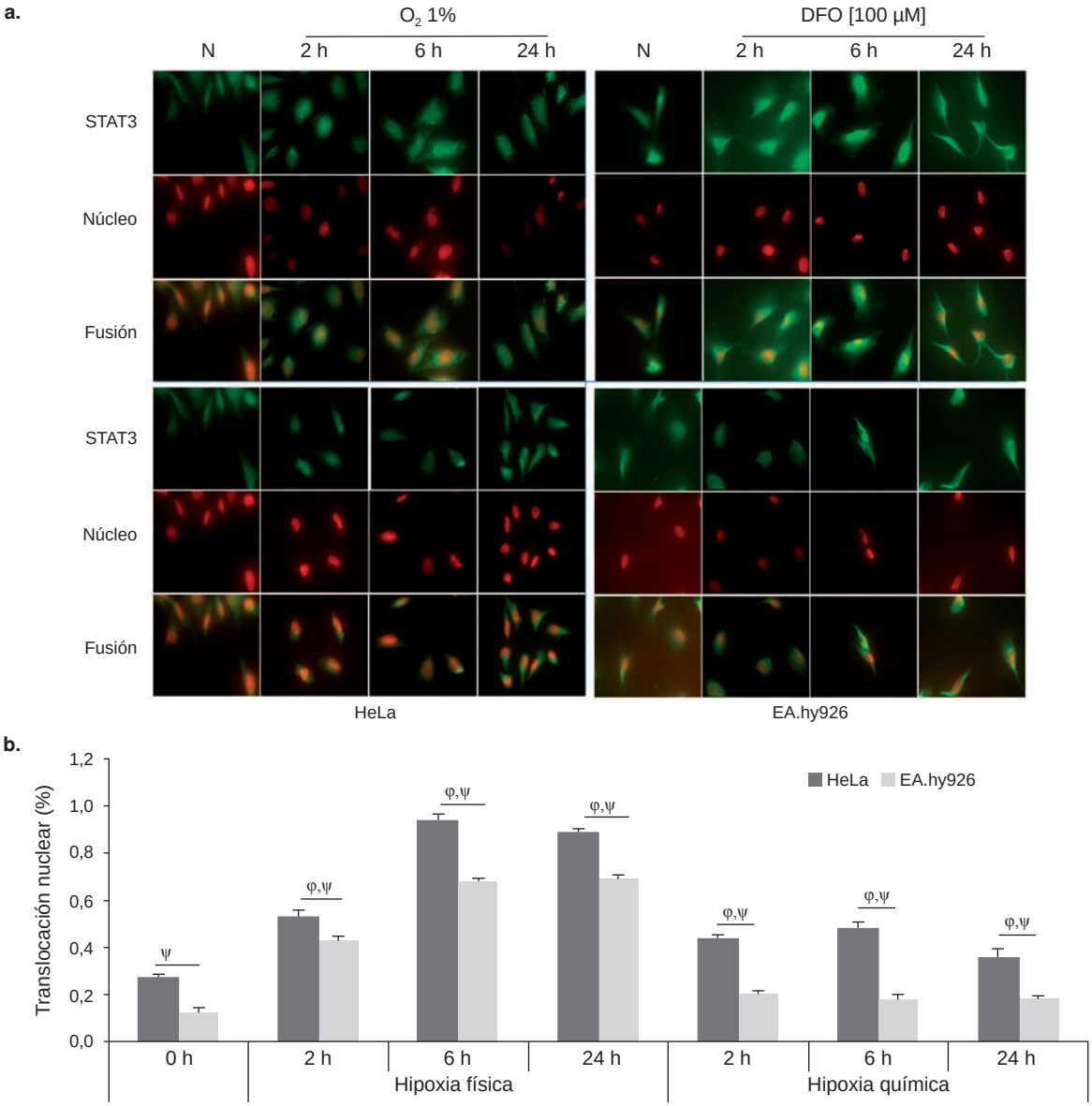


Figura 3. a. Sublocalización celular de STAT3 en células HeLa y EA.hy926 tras la exposición a hipoxia física y química (100 µM de DFO). Las células se cultivaron en portaobjetos y se sometieron durante dos, seis y 24 horas a hipoxia química. Se fijaron y se hicieron permeables; posteriormente, se detectó la proteína STAT3 mediante inmunocitoquímica con anticuerpos fluorescentes, usando anti-STAT3 y Hoescht 33342. **b.** Porcentaje de translocación nuclear de la proteína STAT3 en células HeLa y EA.hy926 tras la exposición a hipoxia física y química. Se contaron las células que presentaron translocación nuclear de la proteína STAT: 100 células por triplicado para cada una de las condiciones. Se hizo la prueba t para medias de dos muestras pareadas entre el control en condiciones de normoxia y cada una de las condiciones de experimentación (φ); se compararon, además, las dos líneas en los diferentes tiempos para los dos tipos de hipoxia (ψ), con $p<0,05$, respectivamente.

crónicas durante intervalos de tiempo superiores a las 24 horas (33). Las condiciones de hipoxia física y química analizadas durante el estudio indujeron la estabilización temprana del HIF-1 y su translocación nuclear a partir de las dos horas de inicio de las condiciones de hipoxia en las dos líneas celulares, dando comienzo a toda la reacción metabólica dependiente de HIF-1.

La expresión de STAT3 está presente en un gran número de líneas celulares y se ha reportado en aquellas de fibroblastos, NIH3T3, cáncer hepático, Hep3B, cáncer de riñón, Caki-1 (34) y cáncer de cuello uterino, como las HeLa, C33a, SiHa y CaSki (16). Se ha señalado que la activación de STAT3, al igual que la de otros miembros de esta familia, no requiere la degradación inducida por un regulador

(35), por lo cual un estímulo que afecte esta vía puede mantener sin modificaciones la cantidad de proteína expresada, lo cual explicaría los resultados observados y plantearía la necesidad de analizar en el futuro su comportamiento en la expresión génica. En estudios anteriores se ha incrementado experimentalmente la expresión de la proteína inactiva en su forma silvestre y se ha demostrado que carece de efectos sobre la progresión tumoral (36).

Los resultados obtenidos muestran que las dos líneas celulares en estudio presentaron una expresión constitutiva de la proteína STAT3 que no varió en las condiciones de hipoxia recreadas. No obstante, se observó una mayor expresión en el modelo endotelial, lo que puede deberse a que esta línea es un híbrido de células de adenocarcinoma de pulmón A549 (37) y de células endoteliales HUVEC, en las cuales se ha observado de manera independiente una expresión constitutiva de esta proteína (34,38). Sin embargo, harían falta más datos experimentales para concluir que esta variación en la expresión es producto del fenotipo endotelial, del tumoral o de la sinergia entre los dos.

La activación de STAT3 *in vitro* como reacción a la hipoxia física se observó tanto en la línea celular tumoral como en la endotelial, lo cual sugiere que el estrés por hipoxia podría proveer una señal común de inducción de un incremento en la expresión de factores de angiogénesis, la migración de las células endoteliales y la angiogénesis durante el proceso de formación del tumor (7,39).

La activación de STAT3 es producto de la fosforilación de un residuo crítico de tirosina en la posición 705 (Y705), la cual induce la dimerización de STAT a través del dominio de interacción SH2-fosfotirosina (40). Además de este residuo, se ha planteado que la actividad de transcripción y unión al ADN son reguladas por otras modificaciones posteriores a la transducción, como la fosforilación de las serinas (S727) (41) y la acetilación reversible del residuo 685 de lisina (42).

La inmunoprecipitación de proteínas con residuos de tirosina fosforilada mostró que, tras la estimulación por hipoxia física, hay un incremento de las formas fosforiladas de la proteína STAT3, la cual se inicia tempranamente tras el estímulo estresante, alrededor de las seis horas en las células HeLa y a las dos horas en las células EA.hy926, y sugiriere que el estrés por hipoxia activa esta vía de señalización presuntamente mediante la fosforilación de la Y705 de la proteína STAT3, tanto en células tumorales como en el modelo endotelial en estudio.

Aunque en la proteína STAT3 se ha observado que la importación al núcleo puede ocurrir de manera independiente a la fosforilación de tirosinas en diferentes tipos celulares, mediante la importina alfa 3 sin estímulos externos (34), los resultados de este estudio demuestran que la translocación de STAT3 se ve afectada por el tipo de línea celular utilizado, pues se observó una mayor translocación en las células tumorales que en las endoteliales ($p<0,05$), y por el tipo de hipoxia, prevaleciendo la física sobre la química ($p<0,05$). Estos resultados indican que la hipoxia física fue un importante estímulo estresante en las dos líneas celulares en estudio, el cual indujo la fosforilación de la proteína STAT3 y su migración al núcleo.

En el estudio de Jung, *et al.*(43), se reportó un incremento significativo de la fosforilación del residuo Y705 de la proteína STAT3 y su posterior translocación nuclear en células de carcinoma renal humano Caki-1, datos que apoyan los resultados obtenidos. En cuanto a la localización de la proteína en la hipoxia física y química, esta podría ser producto de diferencias en la interacción entre el HIF-1α y la STAT3 frente a los estímulos estresantes aplicados, o de la existencia de mecanismos de regulación de STAT3 en la hipoxia independientes de HIF-1 que estimulan su activación, lo cual deberá ampliarse en estudios posteriores.

En diversos estudios se ha evidenciado la importante relación existente entre HIF-1α y STAT3 (44,45), pues la forma fosforilada de STAT3 se une de manera directa a HIF-1α y aumenta su estabilidad al impedir su unión a la proteína VHL, su posterior marcación con ubicuitina y su degradación (46). El mecanismo de acción del DFO, el agente quelante del hierro que se utilizó en este estudio como inductor de la hipoxia física, consiste en bloquear la degradación de HIF-1α inducida por la proteína VHL, con lo cual se provoca su acumulación y la imitación de la reacción celular producida bajo un ambiente de hipoxia (47), lo cual favorece, asimismo, la estabilidad del complejo HIF-1/STAT3 fosforilado.

Resultados recientes han demostrado que la inducción cooperativa de STAT3 y HIF-1 está funcionalmente asociada a la adquisición de resistencia tumoral bajo condiciones de hipoxia; de hecho, STAT3 trabaja de manera sinérgica con HIF-1 para activar y dirigir mediante la activación de genes blanco, el desarrollo del tumor dependiente de HIF-1 bajo condiciones de hipoxia, aunque también se ha demostrado que la STAT3 tiene una actividad independiente de HIF-1 en células en

condiciones de normoxia e hipoxia (26). En estudios en los que se ha utilizado un inhibidor dual de HIF-1 y STAT3, derivado del perileno y conocido como TEL03, se ha demostrado su efecto sobre la expresión de oncogenes (entre ellos, Bcl-2, VEGF, Glut1) regulados por estas dos proteínas en células cancerosas, con lo cual induce la apoptosis en ellas (48).

Hay datos que sugieren que la STAT3 contribuye a la transformación maligna y a la progresión tumoral por transactivación de genes blanco involucrados en eventos críticos del desarrollo tumoral, incluidas la proliferación, la supervivencia, la propia renovación, la invasión y la angiogénesis (49). La proteína STAT3 parece tener un papel crítico en todos estos procesos en el cáncer de cuello uterino, ya que su inhibición puede reducir e inhibir la progresión tumoral en modelos *in vivo* e *in vitro*, mientras que su activación ha demostrado inhibir la apoptosis e inducir un fenotipo más agresivo mediante rutas de señalización específicas (15,50).

Más recientemente, se ha observado que la elevada concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede ser responsable de la activación de STAT3 en la hipoxia en células de glioblastoma, y una alternativa más a la hora de determinar los blancos terapéuticos contra el cáncer (51).

En este estudio, se corroboró la importancia de la hipoxia como un estímulo que modifica la activación de la proteína STAT3 en las células HeLa y EA.hy926, por lo cual constituye un factor importante que debe tenerse en cuenta en el diseño de estrategias terapéuticas contra el cáncer basadas en esta proteína. De igual forma, los resultados del estudio amplían la comprensión de la activación de STAT3 como reacción a estímulos estresantes del microambiente tumoral, lo cual podría constituir una estrategia más efectiva para el tratamiento del cáncer.

Agradecimientos

A la Universidad del Rosario y a Colciencias, por el apoyo en la financiación de este trabajo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que durante este trabajo no tuvieron conflicto de intereses alguno.

Financiación

Este proyecto fue financiado por la Universidad del Rosario. Óscar Ortega recibió financiación del programa “Jóvenes investigadores” de Colciencias, 2010-2011 y de la Universidad del Rosario.

Referencias

1. **Varmus H.** The new era in cancer research. Science. 2006;312:1162-5. http://dx.doi.org/10.1126/science.1126758
2. **Vogelstein B, Kinzler KW**. Cancer genes and the pathways they control. Nat Med. 2004;10:789-99. http://dx.doi.org/10.1038/nm1087
3. **Caffarel MM, Coleman N.** Oncostatin M receptor is a novel therapeutic target in cervical squamous cell carcinoma. J Pathol. 2014;232:386-90. http://dx.doi.org/10.1002/path.4305
4. **Cao Y, DePinho RA, Ernst M, Vousden K.** Cancer research: Past, present and future. Nat Rev Cancer. 2011;11:749-54. http://dx.doi.org/10.1038/nrc3138
5. **Siemann DW.** Tumor microenvironment. Chichester, UK.: John Wiley & Sons, Ltd; 2010. http://dx.doi.org/10.1002/9780470669891
6. **Sullivan R, Graham CH.** Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. Cancer Metastasis Rev. 2007;26:319-31. http://dx.doi.org/10.1007/s10555-007-9062-2
7. **Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouysségur J.** Hypoxia and cancer. J Mol Med. 2007;85:1301-7. http://dx.doi.org/10.1007/s00109-007-0281-3
8. **Liao D, Johnson RS.** Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. Cancer Metastasis Rev. 2007;26:281-90. http://dx.doi.org/10.1007/s10555-007-9066-y
9. **Kenneth NS, Rocha S.** Regulation of gene expression by hypoxia. Biochem J. 2008;414:19-29. http://dx.doi.org/10.1042/BJ20081055
10. **Gadducci A, Guerrieri ME, Greco C.** Tissue biomarkers as prognostic variables of cervical cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2013;86:104-29. http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.09.003
11. **Schindler C, Levy DE, Decker T.** JAK-STAT signaling: From interferons to cytokines. J Biol Chem. 2007;282:20059-63. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R700016200
12. **Paukku K, Silvennoinen O.** STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: Lessons learned from STAT5. Cytokine Growth Factor Rev. 2004;15:435-55. http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.09.001
13. **Bowman T, García R, Turkson J, Jove R.** STATs in oncogenesis. Oncogene. 2000;19:2474-88. http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1203527
14. **Takemoto S, Ushijima K, Kawano K, Yamaguchi T, Terada A, Fujiyoshi N, *et al*.** Expression of activated signal transducer and activator of transcription-3 predicts poor prognosis in cervical squamous-cell carcinoma. Br J Cancer. 2009;101:967-72. http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605212
15. **Fan Z, Cui H, Xu X, Lin Z, Zhang X, Kang L, *et al*.** MiR-125a suppresses tumor growth, invasion and metastasis in cervical cancer by targeting STAT3. Oncotarget. 2015;6:25266-80. http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.4457
16. **Shukla S, Shishodia G, Mahata S, Hedau S, Pandey A, Bhambhani S, *et al*.** Aberrant expression and constitutive activation of STAT3 in cervical carcinogenesis: Implications in high-risk human papillomavirus infection. Mol Cancer. 2010;9:282. http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-9-282

17. **Grote K, Luchtefeld M, Schieffer B.** JANUS under stress--role of JAK/STAT signaling pathway in vascular diseases. Vascul Pharmacol. 2005;43:357-63. http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2005.08.021

18. **Dudley AC, Thomas D, Best J, Jenkins A.** A VEGF/JAK2/STAT5 axis may partially mediate endothelial cell tolerance to hypoxia. Biochem J. 2005;390:427-36. http://dx.doi.org/10.1042/BJ20050351

19. **Levy DE, Darnell JE.** Stats: Transcriptional control and biological impact. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3:651-62. http://dx.doi.org/10.1038/nrm909

20. **Constantinescu SN, Girardot M, Pecquet C.** Mining for JAK-STAT mutations in cancer. Trends Biochem Sci. 2008;33:122-31. http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2007.12.002

21. **Pensa S, Regis G, Boselli D, Novelli F, Poli V.** STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: Two sides of the same coin? En: Madame Curie Bioscience Database. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013.

22. **Pilati C, Amessou M, Bihl MP, Balabaud C, Nhieu JT, Paradis V, *et al*.** Somatic mutations activating STAT3 in human inflammatory hepatocellular adenomas. J Exp Med. 2011;208:1359-66. http://dx.doi.org/10.1084/jem.20110283

23. **Yu H, Kortylewski M, Pardoll D.** Crosstalk between cancer and immune cells: Role of STAT3 in the tumour microenvironment. Nat Rev Immunol. 2007;7:41-51. http://dx.doi.org/10.1038/nri1995

24. **Grivennikov SI, Karin M.** Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2010;21:11-9. http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.11.005

25. **Mauge L, Terme M, Tartour E, Helley D.** Control of the adaptive immune response by tumor vasculature. Front Oncol. 2014;4:61. http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2014.00061

26. **Pawlus MR, Wang L, Hu C-J.** STAT3 and HIF1alpha cooperatively activate HIF1 target genes in MDA-MB-231 and RCC4 cells. Oncogene. 2014;33:1670-9. http://dx.doi.org/10.1038/onc.2013.115

27. **Demaria M, Giorgi C, Lebiedzinska M, Esposito G, D'angeli L, Bartoli A, *et al*.** A STAT3-mediated metabolic switch is involved in tumour transformation and STAT3 addiction. Aging (Albany NY). 2010;2:823-42. http://dx.doi.org/10.18632/aging.100232

28. **Wei L-H, Kuo M-L, Chen C-A, Chou C-H, Lai K-B, Lee C-N, *et al*.** Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. Oncogene. 2003;22:1517-27. http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206226

29. **Martorell L, Gentile M, Rius J, Rodríguez C, Crespo J, Badimon L, *et al*.** The hypoxia-inducible factor 1/NOR-1 axis regulates the survival response of endothelial cells to hypoxia. Mol Cell Biol. 2009;29:5828-42. http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00945-09

30. **Guo M, Song L-P, Jiang Y, Liu W, Yu Y, Chen G-Q.** Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1alpha independent mechanisms. Apoptosis. 2006;11:67-77. http://dx.doi.org/10.1007/s10495-005-3085-3

31. **Joyce JA.** Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. Cancer Cell. 2005;7:513-20. http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2005.05.024

32. **Kaelin WGJ, Ratcliffe PJ.** Oxygen sensing by metazoans: The central role of the HIF hydroxylase pathway. Mol Cell. 2008;30:393-402. http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009

33. **Zhu P, Ning Y, Yao L, Chen M, Xu C.** The proliferation, apoptosis, invasion of endothelial-like epithelial ovarian cancer cells induced by hypoxia. J Exp Clin Cancer Res. 2010;29:124. http://dx.doi.org/10.1186/1756-9966-29-124

34. **Liu L, McBride KM, Reich NC.** STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha3. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:8150-5. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0501643102

35. **Levy DE.** The house that JAK/STAT built. Cytokine Growth Factor Rev.1997;8:81-90. http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6101(96)00054-8

36. **Okamoto W, Okamoto I, Arao T, Yanagihara K, Nishio K, Nakagawa K.** Differential roles of STAT3 depending on the mechanism of STAT3 activation in gastric cancer cells. Br J Cancer. 2011;105:407-12. http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2011.246

37. **Bauer J, Margolis M, Schreiner C, Edgell CJ, Azizkhan J, Lazarowski E, *et al*.** *In vitro* model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: Contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins. J Cell Physiol. 1992;153:437-49. http://dx.doi.org/10.1002/jcp.1041530302

38. **Schutz A, Roser K, Klitzsch J, Lieder F, Aberger F, Gruber W, *et al*.** Lung adenocarcinomas and lung cancer cell lines show association of MMP-1 expression with STAT3 activation. Transl Oncol. 2015;8:97-105. http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2015.02.002

39. **Bertout JA, Patel SA, Simon MC.** The impact of O_2 availability on human cancer. Nat Rev Cancer. 2008;8:967-75. http://dx.doi.org/10.1038/nrc2540

40. **Li WX.** Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. Trends Cell Biol. 2008;18:545-51. http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2008.08.008

41. **Wen Z, Zhong Z, Darnell JE.** Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. Cell. 1995;82:241-50.

42. **Yuan Z-L, Guan Y-J, Chatterjee D, Chin YE.** STAT3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. Science. 2005;307:269-73. http://dx.doi.org/10.1126/science.1105166

43. **Jung JE, Lee HG, Cho IH, Chung DH, Yoon S-H, Yang YM, *et al*.** STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. FASEB J. 2005;19:1296-8. http://dx.doi.org/10.1096/fj.04-3099fje

44. **Xu Q, Briggs J, Park S, Niu G, Kortylewski M, Zhang S, *et al*.** Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. Oncogene. 2005;24:5552-60. http://dx.doi.org/*10.1038*/sj.onc.1208719

45. **Darnell JE.** STAT3, HIF-1, glucose addiction and Warburg effect. Aging (Albany NY). 2010;2:890-1. http://dx.doi.org/10.18632/aging.100239

46. **Jung JE, Kim HS, Lee CS, Shin YJ, Kim YN, Kang GH, *et al*.** STAT3 inhibits the degradation of HIF-1alpha by pVHL-mediated ubiquitination. Exp Mol Med. 2008;40:479-85. http://dx.doi.org/10.3858/emm.2008.40.5.479

47. **Hirsila M, Koivunen P, Xu L, Seeley T, Kivirikko KI, Myllyharju J.** Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway. FASEB J. 2005;19:1308-10. http://dx.doi.org/10.1096/fj.04-3399fje

48. **Chen H, Guan Y, Yuan G, Zhang Q, Jing N.** A perylene derivative regulates HIF-1alpha and Stat3 signaling pathways. Bioorg Med Chem. 2014;22:1496-505. http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.10.018

49. **Demaria M, Poli V.** From the nucleus to the mitochondria and back: The odyssey of a multitask STAT3. Cell Cycle. 2011;10:3221-2. http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.19.17379

50. **Blaskovich MA, Sun J, Cantor A, Turkson J, Jove R, Sebti SM.** Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. Cancer Res. 2003;63:1270-9.

51. **Yu MO, Park K-J, Park D-H, Chung Y-G, Chi S-G, Kang S-H.** Reactive oxygen species production has a critical role in hypoxia-induced Stat3 activation and angiogenesis in human glioblastoma. J Neurooncol. 2015;125:55-63. http://dx.doi.org/10.1007/s11060-015-1889-8

Biomédica 2017;37:131-40
doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3249

NOTA TÉCNICA

Anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante NS3 del virus del dengue

Liliana Morales[1], Myriam L. Velandia[2], María Angélica Calderón[2], Jaime E. Castellanos[2], Jacqueline Chaparro-Olaya[1]

[1] Instituto de Biología Molecular, Laboratorio de Parasitología Molecular, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Instituto de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El dengue es una enfermedad causada por uno de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV) y es endémica en, aproximadamente, 130 países. Su incidencia ha aumentado notablemente en las últimas décadas, así como la frecuencia y la magnitud de los brotes. A pesar de los esfuerzos, no existen tratamientos profilácticos ni terapéuticos contra la enfermedad y, en ese contexto, el estudio de los procesos que gobiernan el ciclo de infección del DENV es esencial para desarrollar vacunas o terapias antivirales. Una de las moléculas del DENV más prometedoras es la proteína no estructural 3 (NS3), la cual es indispensable para la replicación viral y es uno de los principales blancos inmunológicos durante la infección.
Objetivo. Producir anticuerpos policlonales para contribuir a los futuros estudios sobre las interacciones entre la proteína NS3 y otras proteínas celulares.
Materiales y métodos. Se expresaron dos proteínas recombinantes del dominio helicasa de NS3 del DENV de serotipo 2, las cuales se emplearon para inmunizar ratas y producir anticuerpos policlonales.
Resultados. Los anticuerpos producidos fueron útiles en ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia y se reportó por primera vez un anticuerpo policlonal anti-NS3 que permitió la inmunoprecipitación de la proteína viral y la detecta con *Western blot* sin necesidad de inducir sobreexpresión de NS3 o de usar extractos de células marcados metabólicamente con radioisótopos.
Conclusión. Las proteínas recombinantes expresadas y los anticuerpos producidos constituyen herramientas valiosas para estudiar procesos infecciosos del DENV que involucren a la proteína NS3 y evaluar pruebas dirigidas a interferir las funciones de esta proteína.

Palabras clave: virus del dengue; proteínas recombinantes; inmunoprecipitación; producción de anticuerpos; *Western blotting*.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3249

Polyclonal antibodies against recombinant dengue virus NS3 protein

Introduction: Dengue is a disease caused by one of four serotypes of the dengue virus (DENV) and is endemic in approximately 130 countries. The incidence of dengue has increased dramatically in recent decades, as well as the frequency and magnitude of outbreaks. Despite all efforts, there are no prophylactic or therapeutic treatments for the disease. Accordingly, research on the processes governing the DENV infection cycle is essential to develop vaccines or antiviral therapies. One of the most attractive DENV molecules to investigate is nonstructural protein 3 (NS3), which is essential for viral replication and a major immune target for infection.
Objective: To produce antibodies to support future studies on NS3 and its cellular interactions with other proteins.
Materials and methods: Two recombinant proteins of the helicase domain of DENV NS3 serotype 2 were expressed, and used to immunize mice and produce polyclonal antibodies.
Results: The antibodies produced were useful in Western blot and immunofluorescence tests. We report an NS3 antibody that immunoprecipitates the viral protein and detects it in Western blot with no need to over-express it or use cell extracts with metabolic radiolabeling.

Contribución de los autores:
Myriam L. Velandia y Jacqueline Chaparro-Olaya: concepción del estudio
Liliana Morales y María Angélica Calderón: procedimientos de laboratorio
Liliana Morales y Jacqueline Chaparro-Olaya: escritura del manuscrito
Todos los autores participaron en el análisis e interpretación de los datos y aprobaron el manuscrito final.

Conclusion: The recombinant proteins expressed and the antibodies produced constitute valuable tools for studying DENV infectious processes involving NS3 and for evaluating tests designed to interfere with its functions.

Key words: Dengue virus; recombinant protein; immunofluorescence; immunoprecipitation; antibody production; blotting, Western.

doi: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3249

El virus del dengue (DENV) es un miembro del género *Flavivirus* y es el patógeno viral humano transmitido por mosquitos más importante en el mundo. En la actualidad, la incidencia del dengue es 30 veces mayor que hace 50 años y se estima que se presentan anualmente 390 millones de infecciones (1). A pesar de los esfuerzos, no existen vacunas o medicamentos para tratar esta enfermedad.

Hasta el momento se han identificado cuatro serotipos del DENV (DENV 1-4) y todos ellos tienen un genoma de ARN de cadena sencilla y sentido positivo, el cual codifica para una única poliproteína que es procesada para dar lugar a tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (2,3). El procesamiento de la poliproteína es llevado a cabo por proteasas de la célula huésped y por la proteasa viral, la cual está constituida por el dominio N-terminal de la proteína NS3, que actúa con la proteína NS2B como cofactor (4).

Por su parte, la región C-terminal de la proteína NS3 alberga actividades de la enzima helicasa del ARN, del nucléotido del trifosfato de adenosina (NTPasa) (nucleótido de trifosfatasa) (5) y la RTPasa (ARN 5'-trifosfatasa) (6), las cuales convierten la proteína NS3 en una proteína con múltiples funciones durante el ciclo de replicación del DENV. Además, se ha demostrado que la proteína NS3 es una proteína inmunodominante y uno de los blancos más significativos de la reacción de los linfocitos T durante la infección con el DENV (7,8). Todas estas características la han convertido en un blanco terapéutico valioso y, por lo tanto, en un objeto interesante de estudio.

Correspondencia:
Jacqueline Chaparro-Olaya, Instituto de Biología Molecular, Laboratorio de Parasitología Molecular, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque, Avenida Carrera 9 N° 131-A-02,edificio D, segundo piso, Bogotá, D. C., Colombia
Teléfono: (571) 648 9000, extensión 1522; fax: (571) 648 9066
chaparrojacqueline@unbosque.edu.co

Recibido: 18/02/16; aceptado: 31/05/16

El objetivo de este trabajo fue expresar proteínas recombinantes de NS3 y a partir de ellas producir anticuerpos policlonales útiles en ensayos de *Western blot*, inmunofluorescencia e inmunoprecipitación. Estas proteínas recombinantes y los anticuerpos producidos pueden llegar a ser herramientas valiosas en el estudio de las interacciones entre la NS3 y las proteínas celulares, así como en la detección de la replicación viral *in vivo*.

Materiales y métodos

Clonación

El virus DENV2 empleado (INS-2009) es el pasaje 6 de un aislamiento colombiano adaptado a células C6/36, gentilmente cedido por Jairo Méndez del Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud de Colombia. Antes del inicio de este trabajo, se confirmó que se trataba de un DENV2 mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semianidada para los genes de cápside y premembrana (C-PreM), según lo descrito por Chien, *et al.* (9).

Para obtener el ARN viral, se infectaron células C6/36 (ATCC) con el virus INS-2009 y, a partir de los sobrenadantes de los cultivos, se hizo la extracción utilizando el estuche QIAamp Viral RNA® (Qiagen). Para la síntesis del ADN complementario se usó 1 µg del ARN extraído, 200 U de transcriptasa inversa del virus de la leucemia de ratón de Moloney (*Moloney Murine Leukemia Virus*, MMLV) (Promega), 200 U del inhibidor de la ribonucleasa RNAsin (Promega), 0,6 µg de iniciadores aleatorios (Promega) y 0,5 mM de desoxirribonucleótidos de trifosfato (dNTP).

El ADN complementario obtenido se usó como plantilla para amplificar mediante PCR dos regiones del extremo C-terminal de NS3, dominio en el cual se encuentran los epítopos más antigénicos de la proteína (10). Para ello, se usó el genoma de la cepa de referencia 16681 de DENV2 (NC_001474.2), del cual se extrajo la secuencia de nucleótidos que correspondía a la proteína NS3.

Con esta secuencia se alimentó el programa *Primer Designer* (versión 1.01) (http://www.scied.com/pr_cmpro.htm), conservando todos los parámetros

establecidos por defecto y se eligieron dos parejas de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos diseñados daban lugar a dos amplicones de 399 y 606 pb, los cuales correspondían a los aminoácidos 176 a 303 y 403 a 599 de NS3. Como la cepa de referencia 16681 es de origen tailandés, se hizo un alineamiento entre cada uno de los oligonucleótidos diseñados y los genomas de 11 aislamientos colombianos de DENV2 (números de acceso en Genbank: EU854294.1, FJ024473.1, FJ024474.1, FJ024475.1, FJ182012.1, GQ868553.1, GQ868555.1, GQ868556.1, GQ868557.1, GQ868558.1 y GU131947.1). Dos de los oligonucleótidos presentaron una identidad del 100 % con las 11 secuencias analizadas, otro presentó identidad en 14 de 15 residuos y, el otro, en 14 de 17 residuos.

Las secuencias de estos dos últimos se ajustaron para obtener una identidad del 100 % con las secuencias de los aislamientos colombianos, y los cuatro oligonucleótidos fueron sintetizados por Macrogen. Así, el amplicón de 399 pb se obtuvo con el oligonucleótido sentido CATATGCCAGAGATCGAAGATGAC y antisentido GGATCCTAATCGAGTTGAAATGTA, y el amplicón de 606 pb se obtuvo con el oligonucleótido sentido CATATGGACTTTGTGGTCACGAC y antisentido GGATCCTAACCTAGCATCCAACC (las secuencias de reconocimiento para las enzimas NdeI y BamHI aparecen subrayadas).

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 1 mM de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), 200 µM de dNTP, 0,5 U de ADN polimerasa TaqPlatinum (Invitrogen) y 0,5 µM de cada oligonucleótido. El programa de amplificación comprendió una desnaturalización inicial a 95 °C durante tres minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización (a 94 °C durante 30 segundos), hibridación (a 50 °C durante 30 segundos) y extensión (a 72 °C durante 30 segundos), y una extensión final a 72 °C durante cinco minutos.

Los amplicones se purificaron de geles de agarosa con el estuche Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y se clonaron en el vector pJET1.2/blunt (ThermoScientific). Luego, los fragmentos se liberaron por digestión con las enzimas NdeI y BamHI (New England Biolabs, NEB), y se subclonaron en el vector pMALc5x (NEB). En este vector, los fragmentos se insertan corriente abajo del gen *malE* que codifica para una proteína de unión a maltosa (MBP) de 42,5 kDa, lo cual resulta en la expresión de proteínas de fusión MBP. Los dos constructos pMALc5x se usaron para transformar bacterias *Escherichia coli* NEB Express (NEB) y luego se detectaron las colonias positivas mediante PCR. Para confirmar su identidad se purificó ADN 'plasmídico' (WizardPlus SV Minipreps DNA Purification®, Promega) y se usó un servicio de secuenciación (Macrogen). La secuencia se envió al GenBank (número de acceso: KX303476.

Por último, el peso molecular teórico de las proteínas recombinantes denominadas como $NS3^{176_303}$ y $NS3^{403_599}$, se calculó con la herramienta ExPASy compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/).

Producción de las proteínas recombinantes

La expresión de $NS3^{176_303}$ y $NS3^{403_599}$ se hizo en 10 ml de medio Luria Bertani (LB, Sigma) con suplemento de 100 µg/ml de ampicilina (Amresco) (LB+Amp). Los cultivos se incubaron hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600}) de ≈0,4, momento en el cual se añadió isopropil-beta-tiogalactopiranósido (IPTG) (Promega) a una concentración final de 0,3 mM, y se permitió el crecimiento a 37 °C con agitación a 200 rpm.

De cada cultivo se tomaron muestras de 1 ml justo antes de la inducción (tiempo 0), y una, dos, tres y 16 horas después de la inducción. Posteriormente, de cada muestra se tomó una alícuota que se preparó con solución tampón Laemmli y se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) para monitorizar la expresión.

El volumen restante se usó para establecer si las proteínas recombinantes $NS3^{176_303}$ y $NS3^{403_599}$ se encontraban en la fracción soluble o en la insoluble. Para esto, la suspensión bacteriana se centrifugó y los sedimentos se sometieron de nuevo a suspensión en solución tampón de lisis (5 mM de imidazol; 0,5 M de NaCl; 10 % de glicerol; 20 mM de Tris-HCl, pH 7,9; 1 % de Tritron X-100), a choque térmico (10 minutos en nitrógeno líquido seguidos de una incubación a 37 °C), a sonicación y a centrifugación.

Los sobrenadantes y los sedimentos resultantes se sometieron a SDS-PAGE (10 %). A continuación se hizo una expresión a mayor escala inoculando una colonia de cada proteína recombinante en 500 ml (para $NS3^{176_303}$) o 250 ml (para $NS3^{403_599}$) de medio LB+Amp. La expresión se indujo con las mismas condiciones ya descritas y la cosecha de las bacterias se hizo a las tres horas de la inducción para $NS3^{176_303}$ y, a las 16, para $NS3^{403_599}$. Las bacterias se sometieron a lisis como se describió anteriormente y los sobrenadantes se usaron para

hacer una cromatografía de afinidad sobre resina de amilosa (NEB), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las proteínas se liberaron de la resina con solución tampón maltosa (10 mM) y se recolectaron fracciones (500 µl) que se cuantificaron mediante el método de Bradford.

Producción de los anticuerpos

Cada proteína recombinante se inoculó por vía intraperitoneal en dos ratas macho Wistar de cuatro semanas de edad. El esquema de inmunización comprendió una dosis de sensibilización con Imject Alum Adjuvant® (ThermoScientific), una primera dosis de 100 µg de proteína recombinante con adyuvante ocho días después, y dos refuerzos de 50 µg, 15 y 30 días después de la primera dosis. Las ratas se sacrificaron ocho días después de la última inoculación, los sueros se recuperaron y a partir de ellos se purificaron por afinidad los anticuerpos anti-NS3^{176_303} y anti-NS3^{403_599}, siguiendo el protocolo descrito por Smith, *et al.* (11).

Cultivo celular en infección

Las células BHK-21 (ATCC) y A549 (ATCC) se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Sigma) con suplemento de 10 % de suero fetal bobino (FBS) (Hyclone), a 37 °C en una atmosfera de 5 % de CO_2. Cuando las células alcanzaron una confluencia de ≈80 %, se infectaron con DENV2 (aislamiento colombiano INS-2009) (MOI: 1) suspendido en DMEM con FBS al 2 %. Las células se mantuvieron en cultivo hasta 24, 48 o 72 horas después de la infección.

Ensayos de Western blot

A las 48 horas de la infección, las células BHK-21 y A549 se trataron con tripsina (0,25 % de tripsina, 0,5 mM de EDTA), se centrifugaron, y el sedimento se sometió a lisis con solución tampón RIPA (25 mM de Tris-HCl, pH 7,6; 150 mM de NaCl; 1 % de detergente NP-40; 1 % de deoxicolato de sodio; 0,1 % de dodecilsulfato sódico, SDS) y con suplemento de inhibidores de proteasas (Sigma). Los extractos celulares se cuantificaron con el método del ácido bicinconínico y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Para los ensayos de *Western blot* con los sueros crudos de las ratas, se sometieron a SDS-PAGE (10 %) 25 µg de cada extracto celular y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (ThermoScientific), que luego se bloquearon con solución tampón salina con Tween 20 y leche (0,1 % de TBST y 5 % de leche descremada). A continuación, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con diferentes diluciones de los sueros crudos (1:500, 1:1000 y 1:2000 en TBST y leche). Al día siguiente, las membranas se lavaron con TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario (1:10.000) (anti-rata, conjugado con biotina, Pierce 31830) durante una hora a temperatura ambiente y luego se reveló mediante la adición de estreptavidina-HRP (1:10.000) (ThermoScientific), peróxido de hidrógeno (0,02 %) y diaminobencidina (DAB) (0,05 %). Como control, se incubó una membrana con un anticuerpo policlonal anti-NS3 comercial producido en conejo (1:1.000) (GTX124252, GeneTex) y luego con un anticuerpo anti-conejo de unión a biotina (1:2.000) (Sigma B8895), bajo las mismas condiciones ya descritas.

Para los ensayos de *Western blot* con los anticuerpos purificados, se sometieron a SDS-PAGE (8 %) 20 µg de cada extracto celular, y se hizo la transferencia, el bloqueo y la incubación con los anticuerpos anti-NS3^{176}-303 y anti-NS3^{403_599} purificados (1:1000), y con los sueros preinmunes (1:1.000), bajo las mismas condiciones ya descritas. Al día siguiente, las membranas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (1:5000) (anti-rata_HRP, Thermo Scientific, 31470) durante una hora a temperatura ambiente. El revelado se hizo con peróxido de hidrógeno (0,02 %) y DAB (0,05 %).

Ensayos de inmunofluorescencia (IF)

Se sembraron células BHK-21 sobre laminillas previamente tratadas con poli-L-lisina (10 µg/ml) e infectadas con DENV2, como ya se describió. Las células se mantuvieron en cultivo durante 24, 48 o 72 horas, tras lo cual se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se hicieron permeables con Tritón X-100 (0,3 %, Sigma) durante 30 minutos y se incubaron con suero de cabra (Gibco) al 10 % durante tres horas.

A continuación, las laminillas se incubaron durante una hora a 37 °C con el anticuerpo anti-NS3^{176_303} (1:250), el anticuerpo anti-NS3^{403_599} (1:500) o el anticuerpo GTX124252 (1:500), y después, con los respectivos anticuerpos secundarios biotinilados.

Las células se lavaron con solución tampón fosfato salino y se incubaron con estreptavidina acoplada al colorante Alexa 594 (Molecular Probes). Después, se contrastaron los núcleos con una solución de Hoechst 33342 (Sigma), las laminillas se montaron con Vectashield (Vector) sobre una

lámina portaobjeto y se observaron las células bajo microscopio (Zeiss Axioimager A2) utilizando un sistema de fluorescencia X-Cite serie 120Q y el programa ZEN 2012.

Como control positivo, se prepararon laminillas con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína de envoltura (E) del virus de la encefalitis de San Luis (1:500, Millipore MAB8744), el cual tiene reacción cruzada con la proteína E del DENV2. Como anticuerpo secundario en este experimento, se usó un anticuerpo anti-ratón conjugado con biotina (1:200, Vector BA9200). Como controles negativos, se usaron los sueros preinmunes $NS3^{176_303}$ (1:250) y $NS3^{403_599}$ (1:500) en células infectadas, y los anticuerpos anti-$NS3^{176_303}$ (1:250) y anti-$NS3^{403_599}$ (1:500) en células no infectadas.

Ensayos de inmunoprecipitación

Los ensayos de inmunoprecipitación se hicieron con el anticuerpo anti-$NS3^{403_599}$ como modelo de experimentación. Para esto, 10 µl del anticuerpo se agregaron a 200 µg de extracto de células BHK-21 infectadas con DENV2 (obtenido según se describió antes) y la mezcla se incubó en agitación orbital sobre hielo durante cuatro horas. A continuación, se añadieron proteínas A y G inmovilizadas sobre perlas de agarosa (ThermoScientific) y se incubó en agitación toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las perlas se recolectaron por centrifugación, se lavaron con solución tampón de inmunoprecipitación (50 mM de Tris HCl, pH 7,5; 100 mM de NaCl; 0,1 % de Tritón X-100) y se sometieron de nuevo a suspensión con solución tampón Laemmli para ser analizadas por *Western blot*. Se hicieron dos experimentos de control bajo las mismas condiciones ya descritas: en uno se usaron 10 µl de suero preinmune en la inmunoprecipitación y en el otro no se agregó anticuerpo.

Los proyectos en los cuales se enmarca este trabajo (130852128608 y UB.270-2010) cuentan con el aval ético del Comité Institucional de Ética en Investigaciones de la Universidad El Bosque, del 29 de septiembre de 2010.

Resultados

Expresión de las proteínas recombinantes y producción de los anticuerpos

El peso molecular teórico de $NS3^{176_303}$ y $NS3^{403_599}$ se calculó en 58.381 Da (≈58 kDa) y 66.068 Da (≈66 kDa), respectivamente. La expresión de cada proteína recombinante se hizo primero en 10 ml de medio LB+Amp para establecer el tiempo adecuado de cosecha de las bacterias y la solubilidad de cada proteína recombinante.

La expresión de la proteína $NS3^{176_303}$ fue detectable una hora después de la inducción y alcanzó su máximo a las tres horas. La expresión de la proteína $NS3^{403_599}$ fue detectable a las dos horas de la inducción y alcanzó su máximo a las tres horas; sin embargo, se obtuvo más proteína $NS3^{403_599}$ soluble a las 16 horas (no se presentan los datos), razón por la cual se eligió ese tiempo para hacer la expresión a mayor escala. En las figuras 1A y 1B se observa que las dos proteínas migraron a la altura esperada y se detectaron tanto en la fracción soluble (S) como en la insoluble (P).

A continuación, se hizo una expresión a mayor escala seguida por una cromatografía de afinidad sobre resina de amilosa. En las figuras 1C y 1D se observa la SDS-PAGE de las fracciones recuperadas en las cromatografías para las proteínas recombinantes $NS3^{176_303}$ y $NS3^{403_599}$, respectivamente. Se observaron las bandas esperadas y una banda de menor peso molecular (≈42 kDa) que en los ensayos de *Western blot* con un anticuerpo anti-MBP (NEB E8032S), la cual se identificó como la etiqueta MBP (no se presentan los datos).

Para la inmunización de las ratas, se usó como antígeno la mezcla de las fracciones 4 y 5 de la cromatografía para $NS3^{176_303}$ (figura 1C, carriles 4 y 5) y la mezcla de las fracciones 6 y 7 de la cromatografía para $NS3^{403_599}$ (figura 1D, carriles 6 y 7). La concentración de proteína en esas mezclas, determinada mediante el método de Bradford, fue de 650 µg/ml y 740 µg/ml, respectivamente.

Ensayos de Western blot

Los sueros recuperados de las ratas inmunizadas y los anticuerpos purificados se evaluaron en ensayos de *Western blot* sobre extractos de células BHK-21 y A549 infectadas con DENV2. En la figura 2A se observa la inmunodetección de NS3 (≈70 kDa) sobre extractos de células BHK-21 y A549 infectadas con DENV2, usando tres anticuerpos diferentes: el anticuerpo comercial GTX124252 (carril 1), el suero crudo anti-$NS3^{176_303}$ (carril 2) y el suero crudo anti-$NS3^{403_599}$ (carril 3).

Todos los anticuerpos se usaron en una dilución de 1:1000 y reconocieron la proteína NS3 de manera específica y con igual intensidad de señal. La figura 2B muestra la detección de NS3 usando el suero crudo anti-$NS3^{176_303}$, el anticuerpo anti-$NS3^{176_303}$ purificado y el suero preinmune

$NS3^{176_303}$. La proteína NS3 fue visible a la altura esperada (≈70 kDa) en los extractos de células BHK-21 infectadas con DENV2 e indetectable en los extractos de células no infectadas o al usar como anticuerpo primario el suero preinmune. Los mismos resultados se obtuvieron al hacer la detección de NS3 con el suero crudo anti-$NS3^{403_599}$, el anticuerpo anti-$NS3^{403_599}$ purificado y el suero preinmune $NS3^{403_599}$ (figura 2C).

Ensayos de inmunofluorescencia

Se infectaron con DENV2 células BHK-21 mantenidas en cultivo por 24, 48 o 72, fijadas e incubadas con anti-$NS3^{176_303}$ (1:250), anti-$NS3^{403_599}$ (1:500), anti-proteína E (1:500) o el anticuerpo GTX124252 (1:500). La fluorescencia específica para todos los anticuerpos fue detectable en los tres tiempos de cultivo ensayados (no se presentan los datos). La figura 3 corresponde a células fijadas a las 48 horas de la infección y muestra que los anticuerpos anti-$NS3^{176_303}$, anti-$NS3^{403_599}$ y GTX124252 tuvieron una reacción similar. No hubo detección en las células no infectadas al usar anti-$NS3^{176_303}$ (1:250) o anti-$NS3^{403_599}$ (1:500), ni en las células infectadas al emplear usándolos sueros preinmunes $NS3^{176_303}$ (1:250) y $NS3^{403_599}$ (1:500). Las células totales e

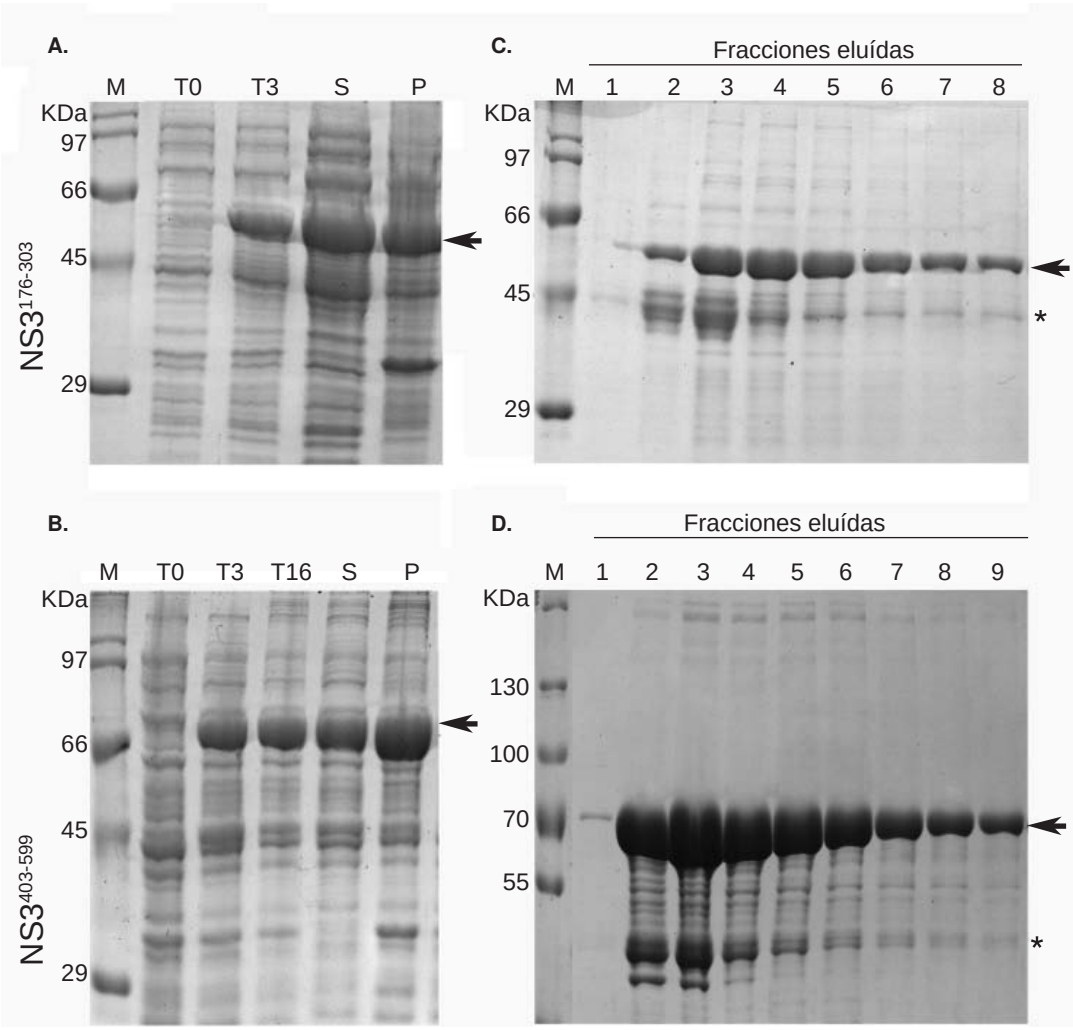


Figura 1. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes $NS3^{176_303}$ y $NS3^{403_599}$. Estas se expresaron como proteínas de fusión MBP y se purificaron mediante cromatografía de afinidad. **A. y B.** SDS-PAGE (10 %) en la cual se observa la expresión de las proteínas recombinantes. M: marcador SDS6H2 (Sigma). T_0: resultado de la lisis de bacterias antes de la inducción de la expresión. T_3: resultado de la lisis de bacterias a tres horas de la inducción. T_{16}: resultado de la lisis de bacterias a 16 horas de la inducción. S: sobrenadante producto de la lisis celular. P: sedimento producto de la lisis celular. S y P corresponden al sobrenadante y al sedimento de T_3 en la figura 1A, y de T_{16} en la figura 1B. Las flechas señalan las proteínas recombinantes. **C. y D.** SDS-PAGE (10 %) en la cual se observan las fracciones de la cromatografía de afinidad para $NS3^{176_303}$ y $NS3^{403_599}$. M: SDS6H2 (Sigma) en la figura C y PageRuler Plus (Fermentas) en la figura D. Carriles 1 al 8 en C, y 1 al 9 en D: fracciones eluídas. Las flechas señalan las proteínas recombinantes. El asterisco señala la etiqueta MBP.

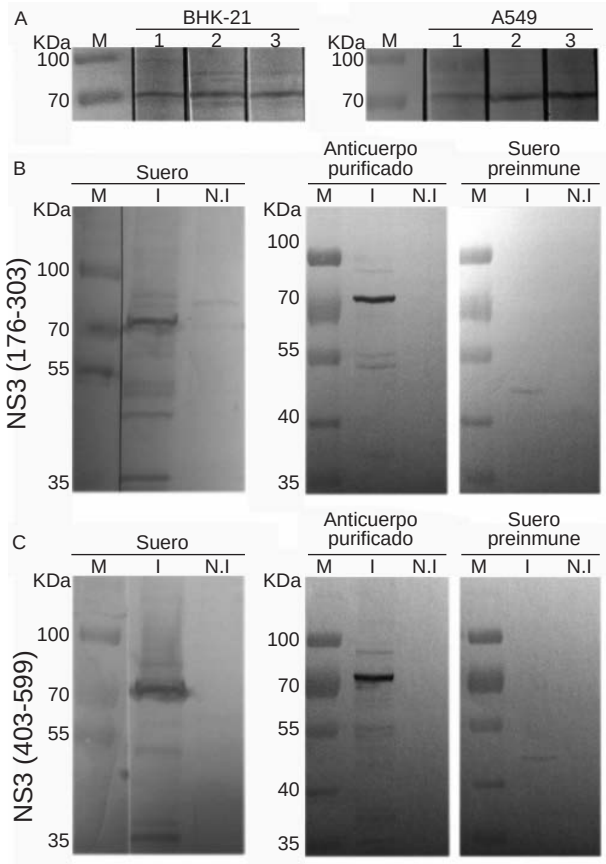


Figura 2. Inmunodetección de la proteína NS3 viral en extractos de células infectadas con DENV2. **A.** Detección de NS3 (≈70 kDa) en extractos de células BHK-21 y A549 infectadas con DENV2. Inmunodetección con anticuerpo comercial (1:1000) (GeneTex. GTX124252), carril 1; suero anti-NS3^{176_303} (1:1000), carril 2; suero anti-NS3^{403_599} (1:1000), carril 3. **B.** Detección de NS3 sobre extractos de células BHK-21 infectadas y no infectadas con DENV2. La inmunodetección se hizo con suero crudo anti-NS3^{176_303}, anticuerpo anti-NS3^{176_303} purificado y suero preinmune NS3^{176_303}. M: marcador PageRuler Plus (Fermentas). I: extracto de células BHK-21 infectadas con DENV2. N.I: extracto de células BHK-21 no infectadas. **C.** Igual que en **B**, pero la inmunodetección se hizo con suero crudo anti-NS3^{403_599}, anticuerpo anti-NS3^{403_599} purificado y suero preinmune NS3^{403_599}.

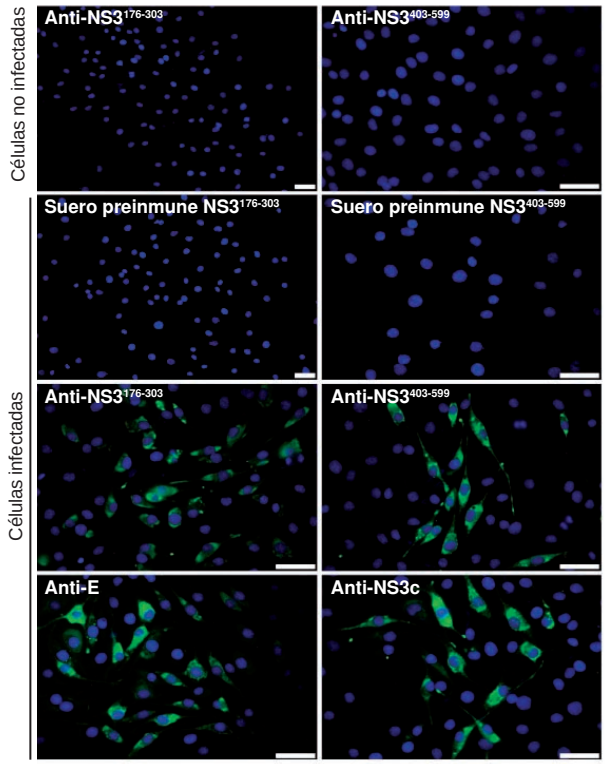


Figura 3. Detección de la proteína NS3 en células BHK-21 infectadas con DENV2. Detección de NS3 en células BHK-21 infectadas con DENV2 (MOI: 1) durante 48 horas. La detección se hizo con los sueros preinmunes NS3^{176_303} (1:250) y NS3^{403_599} (1:500), y con los anticuerpos anti-NS3^{176_303} (1:250), anti-NS3^{403_599} (1:500) y anti-NS3 comercial (NS3c) (1:500) (GeneTex. GTX124252). Como control positivo de la infección, se usó un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína de envoltura (E) (1:500) (Millipore). Los dos paneles superiores corresponden a la detección con los anticuerpos anti-NS3^{176_303} y anti-NS3^{403_599} en células no infectadas. Barra: 50 µm.

infectadas se contaron en las imágenes utilizando la herramienta *cell counter* (*software Image J*) y se determinaron porcentajes de infección de ≈30 % al hacer la inmunodetección con anti-NS3^{176_303} o anti-NS3^{403_599}.

Ensayos de inmunoprecipitación

Los ensayos de inmunoprecipitación se hicieron con el anticuerpo anti-NS3^{403_599} como modelo de experimentación. En la figura 4A se observa que el anticuerpo anti-NS3^{403_599} purificado permitió la inmunoprecipitación de la proteína NS3 en extractos de células BHK-21 infectadas con DENV2. No hubo detección de NS3 al hacer la inmunoprecipitación con el suero preinmune NS3^{403_599} y el *Western blot* con el anticuerpo anti-NS3^{403_599} purificado, y tampoco cuando esta se hizo con el anticuerpo anti-NS3^{403_599} purificado y el *Western blot* con el suero preinmune NS3^{403_599}. En la figura 4B puede observarse que en el ensayo sin el anticuerpo, la proteína NS3 apareció en la fracción no unida y no hubo señal de ella en la inmunoprecipitación. En la figura 4C se ven los resultados de un ensayo de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-NS3^{403_599}, pero esta vez en extractos de células A549 infectadas con DENV2. Los resultados fueron similares a los descritos antes para las células BHK-21, ya que el anticuerpo permitió la inmunoprecipitación de la proteína NS3 presente en las células A549 infectadas de forma específica.

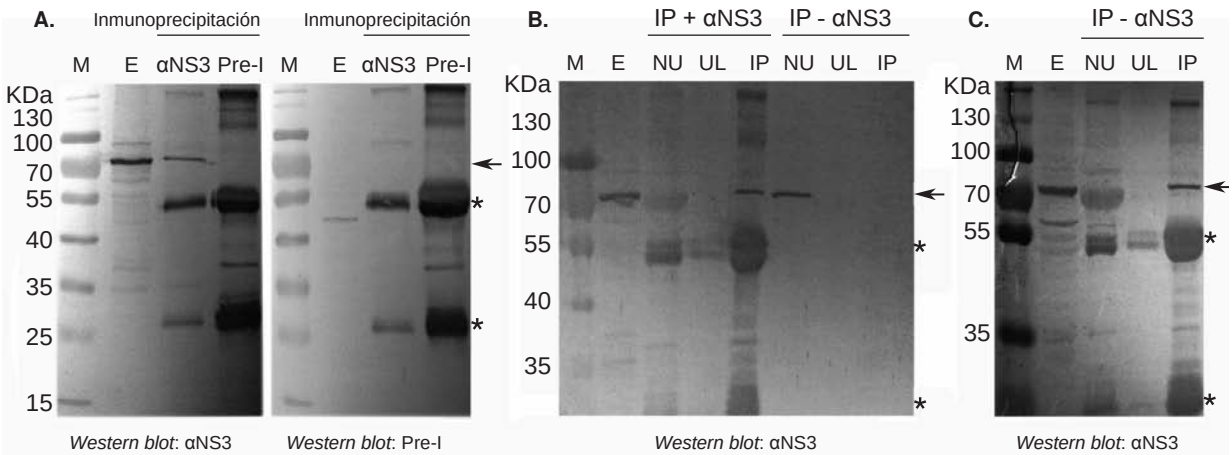


Figura 4. Desempeño del anticuerpo anti-NS3^{403_599} en ensayos de inmunoprecipitación. **A.** *Western blot* con el anticuerpo anti-NS3^{403_599} (α-NS3) o con el suero preinmune NS3^{403_599} (Pre-I), sobre la inmunoprecipitación (IP) con el anticuerpo anti-NS3^{403_599} (IP/α-NS3) o con el suero preinmune NS3^{403_599} (IP/Pre-I). **B.** *Western blot* con anti-NS3^{403_599} sobre las inmunoprecipitaciones con (IP + α-NS3) o sin (IP - α-NS3) anticuerpo anti-NS3^{403_599}. NU: fracción no unida. UL: último lavado de las perlas. **C.** Como en B, pero usando extractos de células A549 infectadas con DENV2. En **A**, **B** y **C.** Las inmunoprecipitaciones se hicieron con 200 µg de extracto de células infectadas con DENV2. La flecha indica la posición de la proteína NS3, y los asteriscos señalan las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas. E: 20 µg de extracto de células BHK21 infectadas. M: marcador PageRuler Plus (Fermentas).

Discusión

En este trabajo se logró la expresión soluble de proteínas recombinantes de dos regiones del dominio helicasa NS3 del DENV2, las cuales se usaron para inmunizar ratas y producir anticuerpos policlonales. Los dos anticuerpos anti-NS3 demostraron su eficacia en ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia, y uno de ellos (anti-NS3^{403_599}), en ensayos de inmunoprecipitación.

La proteína NS3^{176_303} contenía los residuos 176 a 303 de NS3, los cuales corresponden a gran parte del subdominio 1 (residuos 168 a 322) del dominio helicasa de la proteína viral. Por su parte, la proteína recombinante NS3^{403_599} contenía los residuos 403 a 599, los cuales corresponden a parte del subdominio 2 (residuos 323-488) y a gran parte del subdominio 3 (residuos 489 a 618). Las proteínas NS3^{176_303} y NS3^{403_599} se expresaron como proteínas de fusión MBP y ambas se obtuvieron abundantemente en la fracción soluble (figuras 1A y 1B).

Este fue un resultado notable, porque en un trabajo previo en el que se buscaba la expresión individual de los subdominios 1 o 2 del dominio helicasa de NS3, se produjeron proteínas solubles al usar DENV4, pero insolubles con el DENV2. Más aún, en ese mismo estudio la expresión del subdominio 3 produjo proteínas insolubles para ambos serotipos y esa dificultad solo pudo resolverse para DENV4 al expresar una proteína recombinante que contenía los subdominios 2 y 3 (12). Por el contrario, en este trabajo las dos proteínas recombinantes del dominio helicasa de NS3 de DENV2 se obtuvieron de forma soluble y se alcanzaron producciones de ≈2 mg de NS3^{176_303} a partir de 500 ml de cultivo (3 horas después de la inducción) y ≈4 mg de NS3^{403_599} a partir de 250 ml de cultivo (16 horas después de la inducción). Las proteínas recombinantes purificadas se usaron para inmunizar ratas y los anticuerpos, purificados por afinidad, se emplearon en los ensayos de *Western blot*, inmunofluorescencia e inmunoprecipitación.

En los ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia se usó como control el anticuerpo GTX124252 (GeneTex), el cual se produce con una proteína recombinante que comprende los aminoácidos 354 al 568 de NS3.

En los ensayos de *Western blot*, se usaron los sueros crudos anti-NS3^{176_303} y anti-NS3^{403_599} para detectar la proteína viral (≈70 kDa) sobre extractos de células BHK-21 y A549 infectadas con DENV2. El desempeño de estos sueros, medido por la intensidad y la especificidad de la señal y la dilución de trabajo (1:1.000), fue comparable con el del anticuerpo GTX124252 (figura 2A). En los ensayos de *Western blot* en células BHK-21 no infectadas, no hubo detección de NS3, así como tampoco

con los sueros crudos, ni con los anticuerpos anti-NS3^{176_303} y anti-NS3^{403_599} purificados (figuras 2B y 2C). Tampoco hubo detección alguna en la región de ≈70 kDa al hacer el *Western blot* con los sueros preinmunes (figuras 2B y 2C).

Con respecto a la localización celular, además de su ubicación en el citoplasma, NS3 también se asocia a membranas mediante su cofactor NS2B (13). En los ensayos de inmunofluorescencia, tanto el anticuerpo control como los anticuerpos anti-NS3^{176_303} y anti-NS3^{403_599} detectaron la proteína NS3 en el citoplasma y, más intensamente, en la región perinuclear de las células infectadas (figura 3). Esta misma ubicación subcelular había sido descrita en células CV-1 infectadas con DENV2 (14), en células BHK-21 transfectadas con un constructo de NS3 (15) y en células Huh-7.5 y HEK 293T transfectadas con los constructos NS3 o NS2B-NS3 (16). El anticuerpo anti-NS3^{403_599} (1:500) produjo una intensidad y una distribución de fluorescencia comparables a las del anticuerpo GTX124252 (1:500), mientras que el anticuerpo anti-NS3^{176_303} (1:250) produjo una marcación más débil que hizo menos apreciables las prolongaciones citoplásmicas de las células (figura 3).

Por último, aunque en el mercado existen anticuerpos comerciales contra NS3, los fabricantes declaran no haber comprobado su utilidad en experimentos de inmunoprecipitación. Un ensayo de este tipo demanda cerca de 10 µl de anticuerpo primario por reacción y eso hace particularmente costosa esa verificación. Ya que en este trabajo se produjeron aproximadamente 5 ml de cada anticuerpo anti-NS3 por rata, y la dilución de trabajo determinada para el anticuerpo anti-NS3^{403_599} fue igual a la del anticuerpo comercial (GTX124252) en los ensayos de *Western blot* (1:1000) e inmunofluorescencia (1:500), el paso siguiente fue establecer la eficacia de este anticuerpo en ensayos de inmunoprecipitación.

En experimentos descritos en otros estudios, este ensayo se hizo con anticuerpos antietiqueta (15), con sueros anti-NS3 o con fluido ascítico hiperinmune (17,18), usando extractos de células en las que se indujo la sobreexpresión de NS3 o que están marcadas metabólicamente con radioisótopos. Aunque la sobreexpresión facilita la detección de interacciones en las que participa una proteína determinada, los resultados podrían sugerir la existencia de artefactos debidos a la sobreexpresión y no necesariamente a interacciones biológicas reales.

Por otra parte, aunque la marcación metabólica le da al sistema una muy alta sensibilidad y le permite revelar interacciones indetectables con otras técnicas, tiene desventajas como los riesgos de seguridad, la generación de desechos radiactivos y la toxicidad para las células. Por eso, es importante contar con un anticuerpo que en condiciones de cultivo e infección estándar, permita la inmunoprecipitación y detección de proteínas virales de interés, para hacer el posterior análisis de las proteínas celulares que pudieran precipitarse conjuntamente con ella.

En este caso, el anticuerpo anti-NS3^{403_599} permitió la inmunoprecipitación de NS3 en extractos de células BHK-21 infectadas con DENV2 (figuras 4A y 4B). La interacción fue específica, pues no hubo detección de NS3 en el sistema donde se hizo la inmunoprecipitación con el suero preinmune (figura 4A), o en el que no se agregó anticuerpo anti-NS3^{403_599} (figura 4B). El anticuerpo anti-NS3^{403_599} también permitió la inmunoprecipitación de la proteína NS3 sobre extractos de células A549 infectadas con DENV2 (figura 4C).

Comparados con un anticuerpo monoclonal, los anticuerpos descritos en este trabajo pueden producirse más fácilmente, de forma más económica y en menor tiempo. Además, los anticuerpos anti-NS3^{176_303} y anti-NS3^{403_599} fueron eficientes para detectar la proteína NS3 en ensayos de *Western blot* (ambos), inmunofluorescencia (ambos) e inmunoprecipitación (anti-NS3^{403_599}), y no produjeron ruido de fondo con ninguna de las técnicas examinadas.

En conclusión, las proteínas recombinantes expresadas y los anticuerpos policlonales producidos constituyen herramientas valiosas para detectar la replicación viral *in vivo*, estudiar los procesos infecciosos del DENV que involucren la NS3 y evaluar las pruebas encaminadas a interferir con las funciones de esta proteína viral.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses que pudiera influenciar su juicio sobre el presente estudio. Las organizaciones de financiación no tuvieron ningún papel en el diseño del estudio, el análisis de los datos, la decisión de publicar ni en la preparación del manuscrito.

Financiación

Este trabajo contó con el apoyo de Colciencias (proyecto 130852128608) y de la Universidad El Bosque (proyectos UB.270-2010 y PCI 2014-25).

Referencias

1. **Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, *et al*.** The global distribution and burden of dengue. Nature. 2013;496:504-7. http://dx.doi.org/10.1038/nature12060
2. **Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM.** Flavivirus genome organization, expression, and replication. Annu Rev Microbiol. 1990;44:649-88. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.003245
3. **Velandia ML, Castellanos JE.** Virus del dengue: estructura y ciclo viral. Infectio. 2011;15:33-43. http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70074-1
4. **Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ.** Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. J Virol. 1991;65:2467-75.
5. **Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R.** The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. J Virol. 1999;73:3108-16.
6. **Bartelma G, Padmanabhan R.** Expression, purification, and characterization of the RNA 5′-triphosphatase activity of dengue virus type 2 nonstructural protein 3. Virology. 2002;299:122-32. http://dx.doi.org/10.1006/viro.2002.1504
7. **Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Limpitikul W, Tangthawornchaikul N, Malasit P, *et al*.** Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:16922-27. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1010867107
8. **Rivino L, Kumaran EA, Jovanovic V, Nadua K, Teo EW, Pang SW, *et al*.** Differential targeting of viral components by CD4+ versus CD8+ T lymphocytes in dengue infection. J Virol. 2012;87:2693-706. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02675-12
9. **Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJ.** Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. J Clin Microbiol. 2006;44:1295-304. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.4.1295-1304.2006
10. **Costa SM, Yorio AP, Gonçalves AJ, Vidale MM, Costa EC, Mohana-Borges R, *et al*.** Induction of a protective response in mice by the dengue virus NS3 protein using DNA vaccines. PloSOne. 2011;6:e25685. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025685
11. **Smith DE, Fisher PA.** Identification, developmental regulation, and response to heat shock of two antigenically related forms of a major nuclear envelope protein in *Drosophila* embryos: Application of an improved method for affinity purification of antibodies using polypeptides immobilized on nitrocellulose blots. J Cell Biol. 1984;99:20-8. http://dx.doi.org/10.1083/jcb.99.1.20
12. **Zou J, Wang QY, Xie X, Lu S, Yau YH, Yuan Z, *et al*.** Mapping the interactions between the NS4B and NS3 proteins of dengue virus. J Virol. 2015;89:3471-83. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.03454-14
13. **Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG.** Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. Virology. 1998;245:203-15. http://dx.doi.org/10.1006/viro.1998.9156
14. **Kapoor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusukawa J, Ebner KE, Padmanabhan R.** Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. J Biol Chem. 1995;270:19100-6. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.32.19100
15. **Chua JJ, Ng MM, Chow VT.** The non-structural 3 (NS3) protein of dengue virus type 2 interacts with human nuclear receptor binding protein and is associated with alterations in membrane structure. Virus Res. 2004;102:151-63. http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2004.01.025
16. **Heaton NS, Perera R, Berger KL, Khadka S, Lacount DJ, Kuhn R J, *et al*.** Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:17345-50. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1010811107
17. **Arias CF, Preugschat F, Strauss JH.** Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. Virology. 1993;193:888-99. http://dx.doi.org/10.1006/viro.1993.1198
18. **Teo KF, Wright PJ.** Internal proteolysis of the NS3 protein specified by dengue virus 2. J Gen Virol. 1997;78:337-41. http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-78-2-337

Información e instrucciones para los autores

Biomédica es la revista científica del Instituto Nacional de Salud de Colombia. Su fin primordial es la difusión de trabajos originales que contribuyan a ampliar los conocimientos en biomedicina.

Política editorial de la revista

Biomédica acepta y se acoge a los lineamientos establecidos por el *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE) (www.icmje.org), por *Equator Network* (http://www.equator-network.org/) y por el *Committee on Publication Ethics* (COPE) (http://publicationethics.org/) para garantizar la calidad de las publicaciones científicas, su transparencia, integridad y debida salvaguarda de los principios éticos que rigen la investigación biomédica.

La política de reconocimiento de autoría de la revista *Biomédica* se ciñe a la orientación del ICMJE. Este Comité señala que

"El crédito de autoría debe basarse solamente en:

(1) contribuciones sustanciales a la concepción y el diseño del manuscrito, o a la adquisición, análisis e interpretación de los datos;

(2) la redacción del manuscrito o la revisión crítica de contenido intelectual importante;

(3) la aprobación final de la versión que se publicará, y

(4) la asunción de la responsabilidad frente a todos los aspectos del manuscrito, para garantizar que los asuntos relativos a la exactitud o integridad de cualquier parte del mismo sean apropiadamente investigados y resueltos.

Para que a alguien se le reconozca como autor, debe satisfacer las cuatro condiciones mencionadas. La adquisición de fondos, la recolección de datos o la supervisión general del grupo de investigación por sí mismos, no justifican la autoría".

La revista *Biomédica* no acepta la inclusión o el retiro de autores después de haberse iniciado el proceso editorial de los manuscritos. En casos excepcionales en que ello se permita, es obligatorio obtener el consentimiento por escrito de los autores cuyos nombres vayan a ser eliminados del manuscrito o agregados a él. Además, se debe enviar una declaración firmada haciendo constar que todos los autores reúnen los criterios de autoría y que no existen otros autores que, reuniendo los criterios, hayan sido omitidos, y volver a mencionar en detalle la contribución de cada persona a la investigación y al manuscrito.

Registro de ensayos clínicos

Biomédica apoya las políticas de registro de ensayos clínicos de la Organización Mundial de la Salud y del *International Commitee 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 *Biomédic*a 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 ambas 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, Publindex, Latindex, Redalyc, Sibra y otras fuentes bibliográficas pertinentes.

En caso de dudas sobre la forma correcta de citar una referencia (artículo científico, libro, tesis, página de internet, etc.), se sugiere consultar la página http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html, en la cual se encuentran ejemplos de todos y cada uno de los posibles casos.

A continuación se dan algunos ejemplos para el estilo de las referencias, siguiendo las normas de Vancouver.

Revista científica: la forma adecuada de citar revistas científicas es la siguiente (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título. Abreviatura de la revista. Año;volumen:página inicial-página final. http://dx.doi.org/

Ejemplo:

Sánchez J, Villada OA, Rojas ML, Montoya L, Díaz A, Vargas C, *et al*. Efecto del zinc aminoquelado y el sulfato de zinc en la incidencia de la infección respiratoria y la diarrea en niños preescolares de centros infantiles. Biomédica. 2014;34:79-91. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1581

Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. J Immunol Methods. 2004;294:15-22. http://dx.doi.org/10. 1016/j.jim.2004.08.008

Libro o documento: la forma adecuada de citar libros o documentos es (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título. Edición (en los casos que corresponda). Ciudad de publicación: editorial; año. página inicial-página final o número total de páginas.

Ejemplo:

Bernard HR. Research methods in anthropology: Qualitative and quantitative approaches. Second edition. Thousand Oaks, CA: Sage Publications; 1994. 585 p.

Capítulo de libro o documento: la forma adecuada de citar capítulos de libros o documentos es la siguiente (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título del capítulo. En: autor del libro, editores. Título del libro. Edición (en los casos que corresponda). Ciudad de publicación: editorial; año. página inicial-página final.

Ejemplo:

Franco JL, Orrego JC, Montoya CJ, Patiño PJ. Síndrome de infección recurrente. En: Correa JA, Gómez JF, Posada R, editores. Fundamentos

de Pediatría. Tercera edición. Medellín: Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas; 2007. p. 15-50.

***Documentos en páginas web*:** la forma adecuada de citar documentos publicados en páginas web, es la siguiente (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título. Fecha de consulta: día, mes, año. Disponible en: página exacta en donde abre el documento.

Ejemplo:

Ministerio de la Protección Social. Actualización integral del POS 2013. Fecha de consulta: 26 de febrero del 2014. Disponible en: http://www.pos.gov.co/Documents/LISTADO%20MEDICAMENTOS%20ACUERDO%20008%20CRES.pdf.

Cuadros y figuras: los cuadros se elaboran usando el formato de Word; abstenerse de preparar archivos en columnas o tabulados en el texto mismo del manuscrito.

En las preparaciones de microscopio, se deben mencionar la coloración y el aumento según el objetivo utilizado, sin incluir el valor del ocular.

Cuando se utilicen cuadros o figuras que ya hayan sido publicados, se requiere enviar la autorización de la casa editorial que ostenta los derechos de reproducción.

Remisión del manuscrito

El manuscrito debe ser remitido a través del sistema en línea disponible en el enlace de información para autores en http://www.revistabiomedica.org/.

Sin embargo, se debe enviar la carta impresa de remisión firmada en original por todos los autores, en la que conste que todos conocen y están de acuerdo con su contenido, y que el manuscrito no ha sido publicado anteriormente ni se ha sometido a publicación simultánea en otra revista, a la oficina de la revista ubicada en la siguiente dirección:

Revista Biomédica
Instituto Nacional de Salud
Avenida Calle 26 N° 51-20, bloque B, oficina B-245
Bogotá, D.C., Zona 6, Colombia, S.A.

Los autores radicados en otros países pueden enviar la carta de remisión firmada y escaneada desde sus correos electrónicos personales, al correo de la revista (biomedica@ins.gov.co), informando que se entrega por este medio por encontrarse en el exterior.

Solo cuando se reciba la carta de remisión en la oficina de la revista (autores nacionales), o todos los correos (autores internacionales), se iniciará el proceso de revisión editorial del manuscrito.

Al someter un manuscrito para publicación en *Biomédica*, los autores aceptan con su firma, explícita o implícitamente, que:

1) Conocen las instrucciones para los autores y las han seguido detalladamente.
2) Todos los autores cumplen todos los criterios internacionalmente aceptados para ser considerados como tal.
3) No se ha excluido de la lista de autores el nombre de ningún autor que reúna los requisitos para serlo.
4) Todos los autores conocen la versión final del manuscrito sometido para publicación y están de acuerdo con ella.
5) No se ha incurrido en conducta alguna que pueda considerarse como transgresión de la integridad científica o de los principios éticos que rigen las publicaciones científicas.

BIOMÉDICA

Lista de verificación

Con el fin de comprobar que se hayan cumplido todas las instrucciones correspondientes a las normas de publicación de la revista *Biomédica*, le solicitamos que diligencie en línea la siguiente lista de verificación y la presente junto con su manuscrito.

Categoría

___ Artículo original
___ Revisión de tema
___ Comentario
___ Presentación de caso
___ Carta al editor
___ Comunicación breve
___ Reseña histórica
___ Imágenes en biomedicina
___ Haga usted el diagnóstico
___ Reseña bibliográfica
___ Nota técnica
___ Ensayo

1- Presentación

___ Texto escrito a doble espacio en fuente Arial de 12 puntos de tamaño y alineado a la izquierda

___ Páginas numeradas consecutivamente en la esquina inferior derecha

2- Título

___ Se incluyen los títulos en español e inglés (máximo 165 caracteres).

___ Se incluye el título abreviado en español, o inglés en los casos pertinentes (máximo 50 caracteres).

___ Los autores aparecen sólo con su afiliación institucional, sin mencionar cargos ni títulos académicos.

___ El autor de la correspondencia suministró los datos completos: nombre, apellidos, dirección, teléfono, fax y dirección electrónica.

3- Resumen

___ Se incluye el resumen estructurado en español e inglés, con una extensión máxima de 250 palabras y con los siguientes subtítulos: introducción, objetivos, materiales y métodos, resultados y conclusiones.
El resumen estructurado solo se requiere para artículos originales y comunicaciones breves.

4- Palabras clave

___ Se incluyen 6 a 10 por artículo en cada idioma.

___ Se usan las palabras clave en español e inglés indexadas en los Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS) (http://decs.bvs.br/E/homepagee.html) y *Medical Subject Headings* (MeSH) (http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm).

5- Estructura del artículo original, nota técnica y comunicación breve

Se incluyen los siguientes apartados:

___ Introducción

___ Materiales y métodos

___ Resultados

___ Discusión

___ Agradecimientos

___ Declaración de conflicto de intereses

___ Financiación

___ Referencias

___ Cuadros y figuras con sus respectivas leyendas

6- Figuras

___ Se incluye cada una en página aparte, con su respectiva leyenda.

7- Cuadros

___ Se adjuntan en hoja aparte, elaborados en el modelo de tablas de Word, configurados en Arial 10 a espacio sencillo.

___ Se ordenan secuencialmente.

___ Se incluye la leyenda correspondiente.

8- Referencias

___ Las referencias se numeran según el orden de su aparición en el texto.

___ Se ordenan secuencialmente y en el formato adecuado, tal y como lo indican las normas de *Biomédica* en las instrucciones para los autores.

___ Cuando se citan referencias en los cuadros, éstas deben seguir el orden que se venía usando en el texto.

9- Abreviaturas y siglas

___ Se anotan entre paréntesis después de la primera vez que aparezcan, en forma completa y en el idioma original, los términos que se abrevian. Debe evitarse el uso y la creación de siglas que no sean universalmente reconocidas.

10- Nomenclatura

___ Los nombres taxonómicos de género y especie están escritos en letra cursiva.

___ Los nombres de microorganismos se escriben completos la primera vez que se citan, incluso en el título y en el resumen; después, se usa solamente la inicial del género y el nombre completo de la especie.

11- Consideraciones generales

___ Se envió carta impresa firmada por todos los autores o, en caso de autores radicados en el extranjero, una carta de remisión firmada y escaneada desde sus correos electrónicos personales.

___ Se incluyó el formato de declaración de conflicto de interés diligenciado por cada uno de los autores.

___ Se obtuvo autorización del Comité de Ética para la experimentación en humanos o animales, la cual debe incluirse al final de la sección de Materiales y métodos.

___ Se incluyeron el sitio y el número de registro del ensayo clínico, para la intervención y experimentación en humanos.

___ Los autores certifican al Comité Editorial que las personas mencionadas en los agradecimientos tienen conocimiento de dicha mención y están de acuerdo con aparecer en ellos.

___ Todos los manuscritos incluyen una declaración sobre la fuente de financiación.

___ Se envían los nombres de los cuatro evaluadores nacionales y los cuatro internacionales, con sus respectivos datos (nombre, afiliación institucional y correo electrónico).

Instructions to authors

Scope and policy

Biomédica is the quarterly journal of the *Instituto Nacional de Salud of Colombia* [Colombia's National Institute of Health]. Its main purpose is to publish the results of original research that may contribute to expand knowledge in biomedicine.

Editorial policy

Biomédica accepts and subscribes the guidelines established by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) (www.icmje.org), by the Equator Network (http://www.equator-network.org/) and by the Committee on Publication Ethics (COPE) (http://publicationethics.org/) in order to guarantee the quality of scientific publications, their transparency, integrity and full compliance with the ethical principles applicable to biomedical research.

Biomédica's policy on authorship adheres to the ICMJE guidelines, which state in this regard that:

"Authorship should be based solely on the following:

1) Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work;
2) drafting the work or revising it critically for important intellectual content;
3) final approval of the version to be published, and
4) responsibility for all aspects of the manuscript to ensure that matters concerning accuracy and completeness of any of its sections have been appropriately investigated and solved.

All authors should meet these four conditions. Fund raising, data collection or general supervision of the research group do not justify authorship."

Biomédica will not accept the inclusion or withdrawal of any author from the original list once the manuscript has started the editorial process. In exceptional, applicable cases, it will be mandatory to obtain written consent of the author(s) whose name(s) are to be removed from or added to the manuscript. Besides, written consent should be sent stating that all authors meet authorship criteria, and that there are no other authors who meet these criteria and are not mentioned. The document should also describe in detail the contribution of each participant to the research work and to the article.

Clinical trials registration

Biomédica subscribes the policies of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journals Editors (ICMJE) regarding clinical trials registration. Therefore, it will accept for publication only those manuscripts on clinical research exhibiting the identification number from one of the clinical trial registries validated according to the criteria established by WHO and the ICMJE. The identification number and place of registry should be mentioned after the Abstract.

Copyright notice

No national or foreign publication may reproduce or translate articles or abstracts from *Biomédica* without previous written authorization by the Editorial Board.

Privacy statement

The names and e-mail addresses provided to *Biomédica* will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.

Editorial process

All manuscripts submitted for publication to *Biomédica* will be reviewed by the Editorial Board and sent for peer review to at least two experts. To facilitate this process, authors must suggest and send via the journal on-line platform the names, institutional affiliation and e-mail addresses of four national and four international reviewers whose names should not be included in the manuscript.

Once the authors receive the reviewers' comments, they must address each comment, in addition to incorporating the corresponding modifications in the text. The authors must reply to the reviewer comments within two weeks after receiving them; if *Biomédica* has not received the authors' reply during the following four weeks, the paper will be withdrawn.

Once the paper has been accepted for publication, the Editorial Board will not accept modifications in its content, and it will request a copyright transfer statement signed by all authors. Additionally, authors should certify the quality of the English language in the manuscript or in the abstract on a document signed by an expert and sent to the journal before two weeks.

The original manuscripts of articles accepted to be published will remain in the journal files for a minimum of one year after publication. Once the paper has been accepted for publication, and after editing and style correction, authors will receive the galley proofs, which must be carefully reviewed and returned to the editors within 48 hours after receipt by the authors.

Once the paper has been published, the corresponding author will receive five free copies of the journal issue.

Biomédica is an open access journal and it includes citation metadata for all references in published articles, all of which are deposited in CrossRef (http://www.crossref.org/).

General information on manuscripts

Biomédica will publish scientific papers written in Spanish or English, in the following categories:

Original articles: Unpublished manuscripts resulting from biomedical research which present new information about specific aspects and provides a relevant contribution to scientific knowledge.

Short communication: Report of partial or final results of research whose rapid disclosure is of great importance.

Technical note: Detailed description of a new laboratory technique or of modifications done to an established technique, emphasizing the advantages that the process has, or the importance of the innovation developed.

Essay: A philosophical, literary, or scientific manuscript that presents an author's documented opinion about a specific topic or a topic of current interest.

Commentary: A manuscript about an article published in the journal.

History: A manuscript that places emphasis on historical personalities or facts, and their contributions to the development of biomedical sciences or health policies.

Topic review: the current state of the art on a specific topic; it includes two categories:

1) Requested by the Editorial Board to experts on a topic.
2) Presented by professionals interested in a particular topic. For this option, authors must send a proposal indicating why the topic selected is relevant to the readers of *Biomédica* including a brief description, some key references, publications by the authors on the topic that are to be cited (mandatory), unpublished data by the authors that are to be included (mandatory), the probable size of the manuscript and the approximate number of illustrations.

In both categories, authors should include the following elements:

- An abstract with emphasis on the significance of recent findings;
- a pointed introduction to the topic showing past landmarks and present developments;
- appropriate subtitles to facilitate a better understanding of the manuscript;
- the development of the topic is left to the discretion of the authors, but they are advised to include tables, graphics and figures to provide a clearer understanding of the text. In case figures are taken partially or totally from other publications, authors must attach the permission from the copyright holder for their reproduction in *Biomédica*.

Images in biomedicine: An illustrated paper with photographs demonstrating and explaining a concept, a structure, a disease or a biomedical diagnosis. It must include a short commentary emphasizing the importance of the illustrated topic.

Make your own diagnosis: The purpose of papers presented in this category is to challenge the diagnostic ability of readers, using illustrations or photographs of clinical data, or microscopic findings. It has two parts, the clinical presentation and the corresponding findings in the first part, and the correct diagnosis in the second part. The latter should appear on a separate page and with an updated comment on the disease it highlights.

Case presentation: Clinical cases with peculiar presentations or special features of diagnostic value and a brief review of the relevant literature.

Letters to the editor: Readers can request explanations or comment on articles published in the journal. The decision to publish these letters lies on the Editorial Board.

Book review: Brief critical writings on books about health and biomedicine.

Preparation of the manuscript

Please follow the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors that are published as "Recommendations for the Conduct,

Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals" (updated December 2013) (http://icmje.org/icmje-recommendations.pdf).

The manuscript must include the following sections:

Presentation page: This section must include the following items:

- Manuscript title (maximum 165 characters)
- Running title for page headlines (maximum 50 characters)
- Spanish title (maximum 165 characters)
- A paragraph with the authors' full names (include only first family name)
- The institutional affiliation of each author including the name of their group, institution, city and country. The link of authors' names and institutional affiliation should be done using numbers in superscript. Omit positions held and academic qualifications.
- Name of corresponding author, along with postal address, telephone and fax numbers and e-mail address
- A paragraph stating authors' specific contribution to the article.

Abstracts: The manuscript must include a structured abstract (introduction, objective, materials and methods, results and conclusions) in both Spanish and English, not longer than 250 words. The use of references is not allowed in the abstract, and the inclusion of abbreviations and acronyms is not recommended.

Key words: No more than ten key words in each language are permitted. Authors are advised to verify the English keywords in the Medical Subject Headings (MeSH) of the Index Medicus available from http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm, and the Spanish keywords in *Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS)* of the Latin American and Caribbean Health Sciences index available from http://decs.bvs.br

Text: All manuscripts, including the presentation page, abstracts, references, tables and titles of figures and tables, should be in double space. Leave only a single space after the end of each paragraph. Use Arial font size 12 for the text and for table and figure titles, and do not justify the text (left justified). Use italic letters for species names or scientific terms; do not underline for italicization.

Electronic format: The manuscript must be received as an MS Word™ file, preferably in the 97-2003 version. Figures should come attached to the Word document and they should be sent preferably in a 300 dpi tiff format. Graphics made with Power Point™ or MS Word programs are not acceptable because of low resolution. Illustrations are printed in a single column (75 mm) or in two columns (153 mm), therefore, illustrations must be sent in one of these two print sizes. In the case of color illustrations, please use CMYK files in a high resolution tiff format. The best resolution for CMYK files is 300 dpi if the image does not include text. If the image includes text, the recommended resolution is 600 dpi; if it is black and white, the recommended resolution is 1200 dpi. The recommended font for graphics is Helvetic. If your files are Macintosh, please convert them to one of the above formats. A complete list of the files must be sent including the names of the programs in which they were formatted.

Acknowledgements: Authors should certify that persons mentioned in the Acknowledgements have been informed and they have agreed to it. This is not required in the case of institutions.

Conflicts of interest and financial support statements: Authors must place these statements before the References section in separate paragraphs.

Biomédica subscribes the ICMJE recommendations in this respect and adopts their format for the statement of potential conflicts of interest, which should be filled out individually by each author and sent along with the letter of submission. The electronic format is available from http://www.icmje.org/conflicts-of-interest/.

References: Strict adherence to the guidelines of the uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals is required. A number is assigned to each reference as it appears in the manuscript, the tables and figures in ascending order. The reference numbers are placed within parenthesis (not as indices or superscripts).

Personal communications, unpublished data, manuscripts in preparation or submitted for publication, and abstracts presented at congresses or other scientific meetings must not be numbered but rather referenced in the text within parenthesis.

Consult the periodical publications list of Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd7serials7lij.html) for exact abbreviations of journal names. If the

journal is not listed, write its full title. Include only the first six authors of the article, followed by *et al.* The inclusion of national and Latin-American references is recommended. For this purpose, please consult Lilacs, Latindex, Sibra, or Colciencia's indices, and other pertinent bibliographic sources.

The following are some examples of references from different types of publications according to the Vancouver style.

Scientific journal: The adequate way of citing scientific journals is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title. Journal's abbreviated name. Year;volume:initial page-last page. http://dx.doi.org/

Examples:

Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. J Immunol Methods. 2004;294:15-22. http://dx.doi.org/10. 1016/j.jim. 2004.08.008

Sánchez J, Villada OA, Rojas ML, Montoya L, Díaz A, Vargas C, *et al*. Efecto del zinc aminoquelado y el sulfato de zinc en la incidencia de la infección respiratoria y la diarrea en niños preescolares de centros infantiles. Biomédica. 2014;34:79-91. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1581

Book or document: The adequate way of citing books or documents is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title. Edition (when applicable). Place of publication: Publisher; year. Initial page-last page or total number of pages.

Example:

Bernard HR. Research methods in anthropology: Qualitative and quantitative approaches. Second edition. Thousand Oaks, CA: Sage Publications; 1994. 585 p.

Book chapter or document: The adequate way of citing book chapters or documents is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title of chapter. In: name of book author(s), editor(s). Title of book. Edition (when applicable). Place of publication: Publisher; year. Initial page - last page or total number of pages.

Example:

Restrepo A, Tobón AM, Agudelo CA. Paracoccidioidomycosis. In: Hospenthal DR, Rinaldi MG, editors. Diagnosis and treatment of human mycoses. 1st edition. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 127-331.

Documents in web sites: The adequate way of citing documents published in web sites is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title. Citation date: day, month, year. Available from: exact link to open the document.

Example:

Nucci M, Colombo AL. Clinical manifestations and diagnosis of acute/subacute paracoccidioidomycosis. UpToDate. 2012. Citation date: October 15, 2012. Available from: http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-acute-subacute-paracoccidioidomycosis.

Tables and figures: Tables must be formatted using the Word processing tool for this purpose. Do not include columns or tabulations within the text of the manuscript.

Regarding microscope slides, include the staining and lens increase in the objective, but do not include the value of the ocular.

In the case of tables or figures previously published, an authorization by the copyright holder should be attached for publication in *Biomédica*.

Manuscript submission

The manuscript should be submitted to *Biomédica*'s on-line platform using the link "*Información para autores*", available from http://www.revistabiomedica.org/. However, a printed letter signed by all authors stating that they know the contents of the manuscript, that they agree to its submission for publication in *Biomédica,* and explicitly stating that the manuscript has not been published or submitted for publication to any other journal should be sent to the following address:

Revista Biomédica
Instituto Nacional de Salud
Avenida Calle 26 No. 51-20, bloque B, oficina B-245
Bogotá D.C., Zona 6, Colombia

Authors living in foreign countries may send the letter signed and scanned via e-mail to *Biomédica*'s e-mail: biomedica@ins.gov.co, explaining that they do so because they are settled abroad.

Once the printed letter of submission (in the case of local authors), or the e-mails (in the case of authors abroad) have been received at *Biomédica*'s office, the editorial review process will start.

The submission of a manuscript to *Biomédica* for publication implies the acceptance by the authors of the following:

- Full knowledge and strict adherence to the instructions to authors;
- compliance with the internationally accepted authorship criteria;
- inclusion of all authors that meet authorship criteria;
- total agreement with the final version of the manuscript submitted for publication, and
- no engagement in any conduct that may be considered a transgression of the scientific integrity or the ethical principles of scientific publications.

Checklist for submitted manuscripts

For the purpose of verifying that authors have complied with *Biomédica*'s publication guidelines, the corresponding author should include the following checklist along with the manuscript:

Category

___ Original article
___ Short communication
___ Technical note
___ Topic review
___ Historical paper
___ Essay
___ Commentary
___ Images in biomedicine
___ Case presentation
___ Make your own diagnosis
___ Letter to the editor
___ Book review

1. Presentation

___ Text written in double space, in Arial font size 12 point, on one side of letter-size pages

___ Pages numbered consecutively

2. Title

___ Title in Spanish and English (maximum 165 characters)

___ Running title in the same language used in the text of the manuscript (Spanish or English, maximum 50 characters)

___ Authors' names with institutional affiliations (do not include current positions or academic titles)

___ Corresponding author's information: name, postal address, phone number, fax number, e-mail address

3. Abstracts

___ Structured abstract both in Spanish and English (maximum 250 words) using the following subtitles: Introduction, Objective(s), Materials and methods, Results, Conclusion(s). The inclusion of a structured abstract applies only for original articles and short communications.

4. Keywords

___ 6 to 10 per manuscript in each language

___ Keywords in English previously verified in the Medical Subject Headings (MeSH) of Index Medicus available from http://www.nlm.nih.gov/mesh7meshhome.htm, and Spanish keywords verified in *Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS)* of the Latin American and Caribbean Health Sciences index available from http://decs.bvs.br

5. Structure of an original article, technical note or short communication

Include the following sections:

___ Introduction

___ Materials and methods

___ Results

___ Discussion

___ Acknowledgements

___ Conflicts of interest statement

___ Financial support statement

___ References

___ Tables and figures with their corresponding titles.

6. Figures

___ Figures should go on a separate page with its corresponding title

7. Tables

___ Tables should go on a separate page, in Word format using font Arial size 10 and single space

___ Tables should be numbered consecutively in their order of appearance in the text

___ Include titles for all tables and figures.

8. References

___ References should be numbered consecutively according to the order of citation in the text.

___ *Biomedica´*s guidelines for citing references must be followed strictly.

___ If references are cited in tables or figures, please continue with the consecutive order used in the text.

10. Use of abbreviations and acronyms

___ Write the complete term in its original language with the corresponding abbreviation in parenthesis. Avoid using abbreviations and acronyms that are not universally accepted.

11. Nomenclature

___ Names of genus and species are written in italics

___ Microorganisms scientific names should be written in full the first time they appear in the text, as well as in the title and in the abstracts; after, just use the first letter of the genus followed by a dot and the complete name of the species.

12. General considerations

___ Printed letter of submission signed by all authors. In the case of authors living abroad, the letter should be signed, scanned and sent from their personal e-mails.

___ Conflicts of interest statement in the corresponding form filled out by each author.

___ Manuscripts presenting results from research conducted on human subjects or animals include an explicit statement that ethical clearance was requested and obtained from an institutional ethics committee. This statement goes at the end of the Materials and methods section.

___ Site and registration number for clinical trials in human subjects.

___ Authors certify that the persons whose names are mentioned in the Acknowledgements section are fully aware of this and agree to their inclusion.

___ The financial support statement was included.

___ The names, institutional affiliation and e-mails of the four national and four international reviewers suggested by the authors were included in the letter of submission.