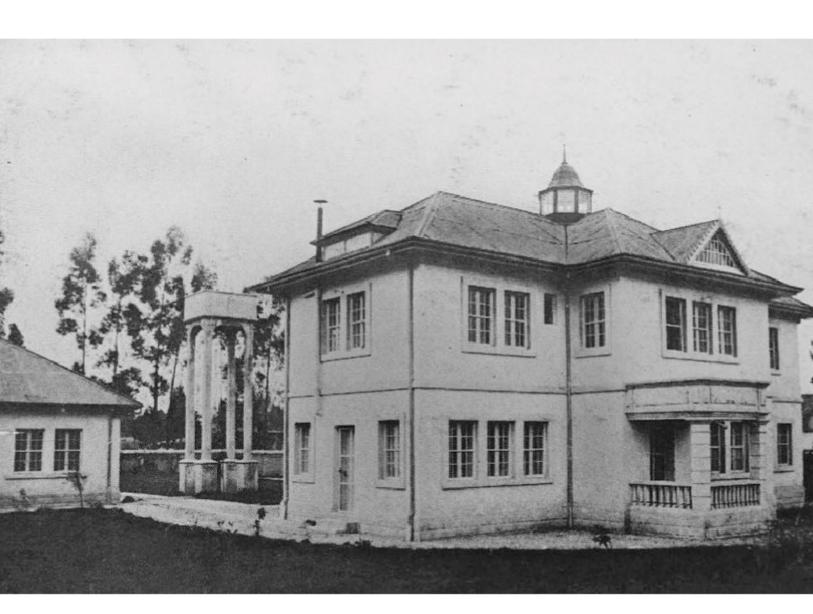
# Biomédica

### Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 37, No. 4 - Diciembre de 2017 Bogotá, D.C., Colombia, S.A.



Portada: Laboratorio de Higiene Samper-Martínez

Fotografía publicada en el Informe elaborado por Pablo García Medina, vicepresidente de la Junta Central de Higiene. Casa editorial de Arboleda y Valencia, 1919

Cortesía de Carlos Fernando Dáguer, asesor, Ministerio de Salud y Protección Social

# Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 37, No. 4 - Bogotá, D.C., Colombia - Diciembre de 2017

#### Comité Editorial

EDITORES LUIS ALBERTO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia Carlos Arturo Hernández Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia RUBÉN SANTIAGO NICHOLLS

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

**E**DITORES **A**SOCIADOS

ENRIQUE ARDILA

Bogotá, D.C., Colombia

José de Jesús Moreno-Montoya Universidad El Bosque Bogotá, D.C., Colombia

Julián Alfredo Fernández-Niño Universidad del Norte Barranquilla, Colombia

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

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

OMAR SEGURA

Federación Médica Colombiana Bogotá, D.C., Colombia

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

Raúl Pardo

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

Gustavo Alonso Cabrera Universidad de Antioquia Medellín, Colombia

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

Alberto Concha-Eastman Guatapé, Colombia

Zollo 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

Carlos Andrés Fandiño

Universidad del Valle Cali, Colombia

José Figueroa

World Health Organization

Ginebra, Suiza

Luis Fernando García Universidad de Antioquia Medellín, Colombia

ALBERTO GÓMEZ

Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, D.C., Colombia

ENRIQUE GONZÁLEZ

University of Texas Health Science Center

at San Antonio

San Antonio, TX, Estados Unidos

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

FELIPE GUHL

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

Antonio Iglesias

Universidad Nacional de Colombia

Bogotá, D.C., Colombia

JORGE JARA

Centers for Disease Control and Prevention, Regional Office for Central America and Panama,

CDC-CAP

Ciudad de Guatemala, Guatemala

ERNESTO JARAMILLO

Organización Mundial de la Salud

Ginebra, Suiza

Marcelo Labruna

Universidade de São Paulo

São Paulo, Brasil

Jairo Lizarazo

Hospital Universitario Erasmo Meoz

Cúcuta, Colombia

JUAN GUILLERMO MCEWEN

Corporación para Investigaciones

Biológicas

Medellín, Colombia

ROBERTO MENDOZA

The Hospital for Sick Children Toronto, Ontario, Canada

ÁLVARO MONCAYO

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

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

María Teresa Ochoa

University of California Los Ángeles Los Ángeles, CA, Estados Unidos

JUAN P. OLANO

University of Texas Medical Branch Galveston, TX, Estados Unidos

BLANCA RESTREPO University of Texas

Brownsville, TX, Estados Unidos

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

University of Texas Medical Branch Galveston, TX, Estados Unidos

GUSTAVO C. ROMÁN

Methodist Neurological Institute Houston, TX, Estados Unidos

Pedro Romero

Ludwig Center for Cancer Research

University of Lausanne Lausana, Suiza

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 Medellín, Colombia Universidad de la Sabana

Chía, Colombia

RICARDO SÁNCHEZ

Universidad Nacional de Colombia

Bogotá, D.C., Colombia

NANCY GORE SARAVIA

Centro Internacional de Entrenamiento

e Investigaciones Médicas

Cali, 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.cobiomedica@ins.gov.co

#### Contenido

Editorial		Estimación del subregistro de casos de enfermedad	
Un siglo del Instituto Nacional de Salud y una proyección para los próximos años		por el virus del chikungunya en Girardot, Colombia, noviembre de 2014 a mayo de 2015 Óscar Pacheco, Máncel Martínez, Ángela Alarcón,	
Martha Lucía Ospina Martínez	441	Mauricio Bonilla, Alexandra Caycedo, Tania Valbuena,	
Presentación de caso		Angie Zabaleta	507
Presentación del síndrome de Wernicke-Korsakoff secundario a encefalitis por citomegalovirus, a propósito de un caso Luis Guillermo Uribe, María Alejandra Pérez, Camilo Andrés Lara, Natalia Rueda, Javier Augusto Hernández	444	Microbiota periodontal y microorganismos aislados de válvulas cardiacas en pacientes sometidos a cirugía de reemplazo de válvulas en una clínica de Cali, Colombia Sandra Moreno, Beatriz Parra, Javier E. Botero, Freddy Moreno, Daniel Vásquez, Hugo Fernández, Sandra Alba, Sara Gallego, Gilberto Castillo, Adolfo Contreras	516
Artículo original		Cómo intervenir y prevenir el retraso del crecimiento	
Sensibilidad <i>in vitro</i> de cepas cubanas de Aspergillus spp. de origen clínico y ambiental Javier L. San Juan, Carlos M. Fernández, Michel Almaguer, Mayda R. Perurena, Gerardo F. Martínez, Rosario E. Velar,		en niños menores de cinco años de hogares incluidos en el Sisbén de Caldas María Victoria Benjumea, José Hernán Parra, Juan Felipe Jaramillo	526
María T. Illnait	452	Curvas de fusión de regiones genómicas específicas:	
Optimización de recursos para determinar la carga viral de HIV-1 en un país con pocos recursos Amalia Girón-Callejas, Ricardo Mendizábal-Burastero, Elizabeth Yax, Axel Martínez, Carlos Mejía-Villatoro	460	una herramienta prometedora para el diagnóstico y tipificación de las especies causantes de la leishmaniasis cutánea en Colombia Johana Marín, Daniel Urrea, Carlos Muskus, María Clara Echeverry, Ana María Mejía, Omar Triana	538
Características de la infección por Clostridium difficile en una institución de alta complejidad y reporte de la circulación en Colombia de la cepa hipervirulenta NAP1/027 Sandra Milena Gualtero, Lina Alejandra Abril, Nathalia Camelo, Susi Daniela Sánchez, Gerson Arias,		Diversidad del ADN mitocondrial en restos óseos prehispánicos asociados al Templo del Sol en los Andes orientales colombianos Andrea Casas-Vargas, Liza M. Romero, William Usaquén, Sara Zea, Margarita Silva, Ignacio Briceño, Alberto Gómez, José Vicente Rodríguez	548
Edwin Silva, Fabián Antonio Dávila, Ingrid Gissel Bustos, Diego Fernando Josa, Isabel Cristina Torres,		Nota técnica	
Luis Carlos Zambrano, María José Pareja	466	Validación de una metodología analítica para determinar bifenilos policlorados en muestras de plasma sanguíneo Boris Santiago Ávila, Carolina Ramírez	561
antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud, Colombia, 2012-2014 María Victoria Ovalle, Sandra Yamile Saavedra, María Nilse González, Andrea Melissa Hidalgo,		El caseinato de sodio incrementa el número de linfocitos B en ratones.  Vanihamín Domínguez, Itzen Aguiñiga, Leticia Moreno, Beatriz Torres, Edelmiro Santiago Osorio	571
Carolina Duarte, Mauricio Beltrán	473	Actualización	
Variantes en los genes <i>TNFA</i> , <i>IL6</i> e <i>IFNG</i> asociadas con la gravedad del dengue en una muestra de población colombiana		Revisión comentada de la legislación colombiana en ética de la investigación en salud Mónica María Lopera	577
Efrén Avendaño-Tamayo, Omer Campo,		Revisión de tema	
Juan Camilo Chacón-Duque, Ruth Ramírez, Winston Rojas, Piedad Agudelo-Flórez, Gabriel Bedoya, Berta Nelly Restrepo	486	El análisis de orina como herramienta diagnóstica en casos de malaria grave Sebastián Barrera, Alberto Tobón-Castaño	590
Valoración mediante espirometría de mineros		•	
del carbón de Paipa, Colombia  Nubia González, Sara Lucía Díaz, Myriam Rocío		In memoriam	
Wilches, Mabel Patricia Franky, César Méndez, Andrea del Rosario Herrera	498	Instrucciones a los autores	

#### **Contents**

Editorial  One hundredth anniversary of the <i>Instituto Nacional de Salud</i> , perspectives for the comming years  Martha Lucía Ospina Martínez	441	Estimation of underreporting of Chikungunya virus infection cases in Girardot, Colombia, from November, 2014, to May, 2015 Óscar Pacheco, Máncel Martínez, Ángela Alarcón, Mauricio Bonilla, Alexandra Caycedo, Tania Valbuena,			
Case presentation		Angie Zabaleta	507		
Wernicke-Korsakoff syndrome secondary to cytomegalovirus encephalitis: A case report Luis Guillermo Uribe, María Alejandra Pérez, Camilo Andrés Lara, Natalia Rueda, Javier Augusto Hernández	444	Periodontal microbiota and microorganisms isolated from heart valves in patients undergoing valve replacement surgery in a clinic in Cali, Colombia Sandra Moreno, Beatriz Parra, Javier E. Botero, Freddy Moreno, Daniel Vásquez, Hugo Fernández, Sandra Alba,			
Original articles		Sara Gallego, Gilberto Castillo, Adolfo Contreras	516		
In vitro susceptibility of Cuban Aspergillus spp. strains of clinical and environmental origin Javier L. San Juan, Carlos M. Fernández, Michel Almaguer, Mayda R. Perurena, Gerardo F. Martínez, Rosario E. Velar,		How to intervene and prevent stunting of children from homes belonging to the Sisbén in Caldas María Victoria Benjumea, José Hernán Parra, Juan Felipe Jaramillo	526		
María T. Illnait	452	High-resolution melting analysis based on specific			
Optimizing resources to reduce costs to determine HIV viral load in limited resources settings Amalia Girón-Callejas, Ricardo Mendizábal-Burastero, Elizabeth Yax, Axel Martínez, Carlos Mejía-Villatoro	460	genomic regions: A promising tool for the diagnosis and typing of species causing cutaneous leishmaniasis in Colombia  Johana Marín, Daniel Urrea, Carlos Muskus, María Clara Echeverry, Ana María Mejía, Omar Triana	538		
Characteristics of <i>Clostridium difficile</i> infection in a high complexity hospital and report of the circulation of the NAP1/027 hypervirulent strain in Colombia <i>Sandra Milena Gualtero, Lina Alejandra Abril, Nathalia Camelo, Susi Daniela Sánchez, Gerson Arias, Edwin Silva, Fabián Antonio Dávila, Ingrid Gissel</i>		Mitochondrial DNA diversity in prehispanic bone remains on the eastern Colombian Andes Andrea Casas-Vargas, Liza M. Romero, William Usaquén, Sara Zea, Margarita Silva, Ignacio Briceño, Alberto Gómez, José Vicente Rodríguez	548		
Bustos, Diego Fernando Josa, Isabel Cristina Torres,		Technical note			
Luis Carlos Zambrano, María José Pareja  Results of the national surveillance of antimicrobial resistance of Enterobacteriaceae and Gram negative	466	Validation of an analytical methodology to determine polychlorinated biphenyls in samples from blood plasma Boris Santiago Ávila, Carolina Ramírez	561		
bacilli in health care-associated infections in Colombia, 2012-2014  María Victoria Ovalle, Sandra Yamile Saavedra,		Sodium caseinate increases the number of B lymphocytes in mouse.  Vanihamin Domínguez, Itzen Aguiñiga, Leticia Moreno,			
María Nilse González, Andrea Melissa Hidalgo, Carolina Duarte, Mauricio Beltrán	473	Beatriz Torres, Edelmiro Santiago Osorio	5/1		
Variants in the TNFA, IL6 and IFNG genes		Update			
associated with dengue severity in a sample of Colombian population  Efrén Avendaño-Tamayo, Omer Campo,		Commented review of the Colombian legislation regarding the ethics of health research Mónica María Lopera	577		
Juan Camilo Chacón-Duque, Ruth Ramírez,		Topic review			
Winston Rojas, Piedad Agudelo-Flórez, Gabriel Bedoya, Berta Nelly Restrepo	486	Urinalysis as a diagnostic tool in severe malaria Sebastián Barrera, Alberto Tobón-Castaño	590		
Spirometry in a population of coal miners in Paipa, Colombia		In memoriam	600		
Nubia González, Sara Lucía Díaz, Myriam Rocío		Indexes	602		
Wilches, Mabel Patricia Franky, César Méndez, Andrea del Rosario Herrera	498	Instructions for authors			

### Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 37, No. 4 - Bogotá, D.C., Colombia - Diciembre de 2017

#### **Editorial**

#### Un siglo del Instituto Nacional de Salud y una proyección para los próximos años

Al comenzar el 2017, el año del centenario del Instituto Nacional de Salud, el eminente doctor José Félix Patiño, conocedor y amigo de esta entidad, escribía en este mismo espacio de *Biomédica* unas palabras que merecen ser repetidas:

"[...] 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 [...]" (1).

Los aniversarios no son más que pretextos para recordar, para actualizar aquellos momentos que nos definen como personas o como instituciones, momentos para hacer balances y proyectar el futuro. A lo largo del año del centenario hemos consagrado una parte de nuestros esfuerzos a ese propósito e, inevitablemente, hemos llegado a la misma conclusión del ilustre doctor Patiño: los aportes del Instituto Nacional de Salud son invaluables para la salud de los colombianos.

Nuestra institución –y no es exagerado decirlo— ha estado presente en los principales avances que hicieron posible que nuestra población casi duplicara su esperanza de vida a lo largo del último siglo: desde la inmunización contra las enfermedades infecciosas y las inversiones en agua segura y saneamiento ambiental hasta el modelado prospectivo de la respuesta dirigida frente a las epidemias emergentes que la globalización del siglo XXI ha traído consigo.

Cada periodo ha venido marcado por su propia prioridad. Por eso, cuando miramos en retrospectiva, encontramos que quizá no hemos sido una sola institución; hemos sido muchas, que podrían concentrarse en cinco momentos:

- 1) Laboratorio de Higiene Samper-Martínez. Creado en 1917 como una iniciativa privada de los doctores Bernardo Samper Sordo y Jorge Martínez Santamaría, constituye el tronco de la historia. Básicamente, nació como un laboratorio de diagnóstico, análisis y elaboración de productos biológicos, como el suero antidiftérico y la vacuna antirrábica. El rápido prestigio ganado en un país azotado por las enfermedades infecciosas y con precarias capacidades para afrontar epidemias es una muestra fehaciente de que su creación respondió a una necesidad sentida de la sociedad. La calidad de su trabajo fue reconocida por la Fundación Rockefeller, con la cual trabajó conjuntamente en el estudio de la fiebre amarilla, y cuyos representantes lo consideraron como uno de los laboratorios mejor dotados de América Latina.
- 2) Instituto Nacional de Higiene Samper-Martínez. Así se denominó la entidad en 1929, tras haber sido adquirida por el Estado en desarrollo de una ley de 1925 que autorizaba al Gobierno la compra. Bajo este nombre se agruparon el Laboratorio Oficial de Higiene, el Parque de Vacunación y el propio Laboratorio Samper-Martínez. La investigación sobre higiene, el análisis químico y bacteriológico, el estudio de epidemias, la producción de biológicos, la aprobación de productos medicinales y la formación del personal del sector fueron las funciones asignadas a la nueva entidad oficial. Este fue un periodo de gran relevancia, y significó la institucionalización de la medicina de laboratorio en Colombia y el tránsito hacia un concepto de salud pública, siguiendo las tendencias de la práctica médica en Estados Unidos.
- 3) Instituto Nacional de Salud. La fusión del Instituto Nacional de Higiene Samper-Martínez con el Laboratorio de Higiene Industrial, el Laboratorio de Control de Productos Farmacéuticos, el Laboratorio

de BCG y el Instituto de Estudios Especiales "Carlos Finlay" dio nacimiento al Instituto Nacional de Salud. El legado de este último –que recoge el esfuerzo realizado con la Fundación Rockefeller en la investigación sobre la fiebre amarilla durante los años treinta y cuarenta—, daría un fuerte impulso al desarrollo de la Virología, la Parasitología y la Entomología dentro de la entidad. En esta época comenzó a consolidarse en el Instituto una tendencia mundial: el paso del análisis de casos particulares al análisis de situaciones generales de salud, con estudios sobre la prevalencia de las enfermedades y su distribución geográfica. El análisis, la interpretación y la divulgación de los resultados del Estudio de Recursos Humanos para la Educación Médica en Colombia (1964) y de la Investigación Nacional de Morbilidad (1965-1966) marcaron el ingreso decidido de la Epidemiología en la entidad.

- 4) Instituto Nacional de Programas Especiales de Salud (INPES). Este fue el resultado de la integración del Instituto Nacional de Salud con la organización a cargo del Plan Nacional de Saneamiento Básico Rural, que desde los años sesenta operaba en el Ministerio de Salud y era responsable de la construcción de acueductos para conglomerados de menos de 2.500 habitantes. El nombre INPES se mantuvo hasta 1975, y la División de Saneamiento Básico Rural siguió operando dentro del Instituto Nacional de Salud hasta 1989. Aunque la magnitud del programa redujo la importancia de las demás áreas de la entidad, durante estas dos décadas se produjeron hitos de gran relevancia en la salud pública: la conformación de la Red Nacional de Laboratorios (1977), la erradicación de la viruela (1979) y la publicación de estudios que generaron un conocimiento fundamental sobre la realidad de la salud en Colombia y una base sólida para la adopción de decisiones, como fueron el Estudio Nacional de Salud (1977-1980) y la Encuesta Nacional de Salud sobre Conocimientos, Actitudes y Prácticas (1986-1989).
- 5) El *Instituto Nacional de Salud* del siglo XXI. La Ley 100 de 1993 trajo consigo los cambios fundamentales que definirían la estructura del Instituto Nacional de Salud en el nuevo siglo. Uno de los más significativos fue la entrega del análisis y la aprobación de productos farmacéuticos al Instituto Nacional de Vigilancia de Alimentos y Medicamentos (Invima), creado por dicha ley. En este periodo, el Instituto suspendió la producción y exportación de gran cantidad de productos biológicos para concentrarse en aquellos que no eran de interés para la industria farmacéutica. Sin embargo, el rasgo de identidad definitivo en los albores del nuevo milenio ha sido la asunción de funciones de vigilancia epidemiológica, tarea que, por su transparencia y calidad, le ha granjeado reconocimiento internacional a la entidad.

No cabe duda, esta es una historia de reinvenciones, de cambios continuos que ponen de manifiesto una gran capacidad de adaptación, de capas de conocimiento que se disponen sobre otras, de un bagaje que se acumula y se enriquece. No de otra manera se entiende el abanico de reconocimientos que hemos recibido de una miríada de instituciones del sector: condecoraciones de la Academia Nacional de Medicina y del Observatorio Intersectorial de Cáncer Infantil; la Orden Lorencita Villegas de Santos; una nota de estilo del Concejo de Bogotá; reconocimientos de Tephinet por el Programa de Epidemiología de Campo de Colombia; del Departamento Administrativo Nacional de Estadística por la calidad estadística del Sivigila, y de los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de Estados Unidos.

Todas estas condecoraciones y reconocimientos generan orgullo, pero también mayores responsabilidades. Al llegar al centenario, aparecen nuevos retos acordes con los tiempos.

Uno de ellos es cubrir la demanda de productos que no interesan a la industria farmacéutica, como son los sueros antivenenos, cuyos beneficiarios tal vez sean muy pocos, pero provienen casi siempre de regiones apartadas, por lo que dicha producción será una forma de cerrar brechas sociales y de favorecer un acceso equitativo a la salud.

La vigilancia en salud pública seguirá siendo en los próximos años la tarea principal de la entidad, complementada con una capacidad cada vez más sólida de respuesta articulada con las demás entidades del Estado.

También tendremos que ser reconocidos como centro docente. No tiene lógica que casi todos los doctores de las ciencias biológicas en Colombia, centenares de magísteres y miles de estudiantes de pregrado hayan pasado por el Instituto y, sin embargo, en sus diplomas no se observe ni un pequeño recordatorio del Instituto Nacional de Salud, dado que no tiene carácter de entidad educativa.

Es justo reconocer que el Instituto no ha estado solo en su historia. Esta entidad hereda conocimientos y recibe apoyo. Todo logro es resultado de las lecciones del pasado y de la participación de otras personas o instituciones en el presente. Recordemos una vez más las palabras del doctor Patiño: si pasamos a la historia, también es por la acción de hombres y mujeres notables de otras grandes instituciones.

Nuestro centenario es también un homenaje a los esfuerzos mancomunados y al trabajo interinstitucional e intersectorial. Gracias a esos esfuerzos también somos lo que somos. Por eso podemos decir que no cumplimos cien años, sino que llevamos cien años cumpliéndole al país.

Martha Lucía Ospina Martínez Directora General Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

#### Referencias

1. Patiño, JF. El Instituto Nacional de Salud, una institución paradigmática. Biomédica. 2017;37:5-7.

#### PRESENTACIÓN DE CASO

## Presentación del síndrome de Wernicke-Korsakoff secundario a encefalitis por citomegalovirus, a propósito de un caso

Luis Guillermo Uribe<sup>1</sup>, María Alejandra Pérez<sup>2</sup>, Camilo Andrés Lara<sup>3</sup>, Natalia Rueda<sup>2</sup>, Javier Augusto Hernández<sup>2</sup>

- <sup>1</sup> Departamento de Infectología, Hospital Universitario de Bucaramanga "Los Comuneros", Bucaramanga, Colombia
- <sup>2</sup> Medicina General, Hospital Universitario de Bucaramanga "Los Comuneros", Bucaramanga, Colombia
- <sup>3</sup> Radiología IDIME, Hospital Universitario de Bucaramanga "Los Comuneros", Bucaramanga, Colombia

El citomegalovirus (CMV) es uno de los microorganismos oportunistas con mayor prevalencia en pacientes inmunocomprometidos, aunque su reactivación ha descendido después de la introducción de la terapia antirretroviral altamente activa (*Highly Active Antiretroviral Therapy*, HAART). En las coinfecciones, la encefalitis se ha reportado como una de las condiciones más frecuentes. Se presenta el caso de un paciente adulto joven con infección por virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) que tuvo un rápido deterioro neurológico evidenciado en síntomas y signos clínicos clásicos del síndrome de Wernicke-Korsakoff y que no presentaba factores de riesgo para deficiencia de tiamina. En las imágenes de la resonancia magnética cerebral, se detectaron hallazgos típicos del síndrome, y se identificó citomegalovirus (CMV) en el líquido cefalorraquídeo. Con el tratamiento específico para el CMV, se logró el control de los síntomas, aunque hubo secuelas neurológicas que mejoraron. Este es uno de los pocos casos reportados a nivel mundial de síndrome de Wernicke secundario a encefalitis por citomegalovirus.

**Palabras clave:** encefalitis viral; citomegalovirus; síndrome de Korsakoff; encefalopatía de Wernicke; encefalitis infecciosa; infecciones por citomegalovirus.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3451

#### Wernicke-Korsakoff syndrome secondary to cytomegalovirus encephalitis: A case report

Cytomegalovirus (CMV) is one of the opportunistic microorganisms with the highest prevalence in immunocompromised patients. Reactivation has decreased after the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART). Encephalitis has been reported in the coinfection as one of the most frequent presentations.

We present the case of a young adult patient with HIV infection and rapid neurological deterioration due to classic clinical symptoms and signs of the Wernicke-Korsakoff syndrome, with no risk factors for thiamine deficiency, with images by nuclear magnetic resonance typical of the syndrome, and identification of cytomegalovirus in cerebrospinal fluid. The specific treatment for CMV managed to control the symptoms with neurological sequelae in progression towards improvement.

This is one of the few cases reported in the literature of Wernicke syndrome secondary to cytomegalovirus encephalitis.

**Key words:** Encephalitis, viral; cytomegalovirus; Korsakoff syndrome; Wernicke encephalopathy; infectious encephalitis; cytomegalovirus infections.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3451

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) continúa siendo una de las de mayor trascendencia en el mundo; los informes epidemiológicos internacionales indican que, si bien la incidencia ha disminuido de 2,2 millones de personas infectadas en el 2010 a 2,1 millones en el

2015, la prevalencia ha aumentado de 33,3 millones a 36,7 millones en el mismo periodo. Por otra parte, las muertes relacionadas con el sida se han reducido de 1,5 millones en el 2010 a 1,1 millones en el 2015 (26 %) (1). Ello significa que las tasas de transmisión han disminuido y que la expectativa

#### Contribución de los autores:

Luis Guillermo Uribe, María Alejandra Pérez y Javier Hernández: descripción del caso clínico y del marco teórico sustentado durante la discusión

Camilo Lara y Natalia Rueda: resumen de presentación del artículo, descripción de los aspectos radiológicos del caso clínico, sustentación de los hallazgos en imágenes descritos en casos previamente publicados

Todos los autores contribuyeron a la discusión y la edición del manuscrito.

de vida es mayor, con el consecuente desafío de lograr el control de las complicaciones relacionadas directamente con el estado inmunitario.

La infección primaria por citomegalovirus (CMV) se presenta de forma subclínica en la mayoría de las personas; sin embargo, su reactivación puede ser grave en los pacientes inmunocomprometidos. La forma más común en pacientes con HIV es la retinitis, seguida de manifestaciones gastrointestinales y, posteriormente, del compromiso neurológico, pulmonar, hepático y suprarrenal (2). Desde la introducción de la terapia antirretroviral altamente activa (*Highly Active Antiretroviral Therapy*, HAART), la incidencia del compromiso orgánico por CMV ha disminuido, pues se han limitado las reactivaciones (3).

La relación entre el curso clínico de la infección por HIV y el de la infección por CMV es estrecha; en los pacientes que presentan la coinfección, se ha observado elevación de los valores de CD8 y, escasa relación entre los CD4 y los CD8 como efecto secundario de la infección por citomegalovirus. En pacientes que no tienen infección por CMV, se ha visto una recuperación más rápida con la HAART(4), en tanto que la persistencia de dicha infección se ha asociado con mayores cargas virales de HIV (5-6). En los pacientes infectados con HIV y CMV, también se ha observado un mayor riesgo de condiciones clínicas no relacionadas con el sida (aterosclerosis y afecciones cardiovasculares) (7).

#### Caso clínico

Se trata de un paciente de sexo masculino de 26 años de edad con antecedentes de asma e infección por HIV diagnosticada dos años antes, y tratado con abacavir, lamivudina y zidovudina con un cumplimiento del tratamiento del 100 %.

En el momento de la consulta por urgencias, la carga viral era de menos de 20 copias y el recuento de CD4 era de 612 cel/µl. Una semana antes de su ingreso en urgencias, había terminado el tratamiento de ocho meses con isoniacida y piridoxina para tuberculosis latente.

Consultó por un cuadro clínico de un mes de evolución con vómito ocasional de alimentos precedido de náuseas, aunque sin dolor abdominal ni

Correspondencia:

María Alejandra Pérez, Carrera 49 N° 73-04, casa A6, Bucaramanga, Colombia

Teléfonos: 690 8517 y (316) 422 4089 mariaperezardila@gmail.com

Recibido: 20/07/16; aceptado: 01/03/17

deposiciones líquidas. Desde la semana anterior, tenía cefalea difusa asociada a diplopía, vértigo, ataxia y paraparesia. En el examen físico de ingreso, se lo encontró somnoliento, con un puntaje de Glasgow de 13/15 asociado a nistagmo horizontal, ataxia y fuerza de 4/5 en los grupos proximales y distales de las extremidades, y sin alteraciones en el fondo de ojo.

En los exámenes de laboratorio practicados en el momento de su ingreso, no se encontraron alteraciones (cuadro 1). Debido a los antecedentes de vómito, se practicó un estudio endoscópico de vías digestivas altas y se detectó ulceración en el esófago medio sugestiva de infección por CMV. Además, dados los síntomas neurológicos que presentaba, se le hizo una punción lumbar y se encontró hiperproteinorraquia leve sin otras alteraciones (cuadro 2); los cultivos del líquido cefalorraquídeo para microorganismos comunes, hongos y *Mycobacterium tuberculosis* fueron negativos.

Los estudios se complementaron con una resonancia magnética (RM) cerebral (figuras 1-3), en la cual se encontraron signos radiológicos de encefalopatía de Wernicke.

El paciente presentó un rápido deterioro neurológico con progresión a estado de coma asociado a taquicardia sostenida, por lo cual se inició el

**Cuadro 1.** Resultados de los exámenes de laboratorio del paciente en el momento del ingreso.

Exámenes iniciales	Valores del paciente	Valores de referencia
Leucocitos (cél/µl)	7.660	5.000-10.000
Granulocitos (%)	64	50-62
Linfocitos (%)	24 %	25-40
Hemoglobina (g/dl)	19,2	14-18
Hematocrito (%)	56	42-52
Plaquetas (cél/µl)	296.000	150.000-500.000
PCR (mg/dl)	12	0-6
Velocidad de sedimentación	12	2-30
globular (mm/hora)		
ASAT (U/L)	52	0-38
ALAT (U/L)	117	0-41
Bilirrubina total (mg/dl)	1,25	0-1
Bilirrubina directa (mg/dl)	0,79	0-3
Fosfatasa alcalina (U/L)	81	40-129
Creatinina (mg/dl)	0,71	0,7-1,2
BUN (mg/dl)	10,7	6-20
Vitamina B <sub>12</sub> (pg/dl)	402,3	197-771
Ácido fólico (ng/dl)	2,54	4,5-32,2
Carga viral de CMV sérico	Menor de 500 copias/ml	

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; ASAT: amino aspartato transferasa; ALAT: alanina amino transferasa; BUN: nitrógeno ureico en sangre; CMV: citomegalovirus

tratamiento con ceftriaxona y vancomicina, además de ganciclovir para contrarrestar el compromiso gastrointestinal por CMV y la sospecha de encefalitis asociada al virus; se inició, asimismo, tratamiento con tiamina (el paciente no tenía antecedentes de consumo de alcohol).

Cuando se constató la elevación de la carga viral de CMV en el líquido cefalorraquídeo, se suspendió la administración de los antibióticos y de la tiamina, y se continuó únicamente con ganciclovir. El paciente presentó mejoría clínica neurológica tras completar los primeros 12 días de administración intravenosa de ganciclovir, pero con secuelas como diplopía, parálisis del VI par,

**Cuadro 2.** Valores del análisis citoquímico del líquido cefalorraquídeo en el momento del ingreso

Análisis citoquímico	Valores del paciente	Valores de referencia
Color	Incoloro	Incoloro
Glucosa (mg/dl)	80	40 a 70
Glucemia sérica (mg/dl)	119	70 a 110
Proteínas (mg/dl)	57,4	15 a 45
Leucocitos (cél/µl)	0	0
Eritrocitos (cél/µl)	0	0
VDRL	No reactivo	0 diluciones
Antígeno de Cryptococcus	Negativo	
Tinción de ZN, KOH y	Negativas	
tinta china		
PCR para Herpes virus	Negativo	
Carga viral de CMV*	1.180 copias/ml	
ADA (U/L)	1	0 a 5

<sup>\*</sup> Carga viral en líquido cefalorraquídeo mediante RT PCR (plataforma LightCycler® 2.0, Roche)

VDRL: prueba serológica para la sífilis; ZN: cinc; KOH: hidróxido de potasio; CMV: citomegalovirus; ADA: adenosina desaminasa

fuerza de 3/5 en los grupos musculares proximales de las extremidades y falla respiratoria crónica con necesidad de traqueostomía. En cuanto a los síntomas gastrointestinales, no presentó nuevos episodios de vómito, pero requirió gastrostomía por trastorno de la deglución.

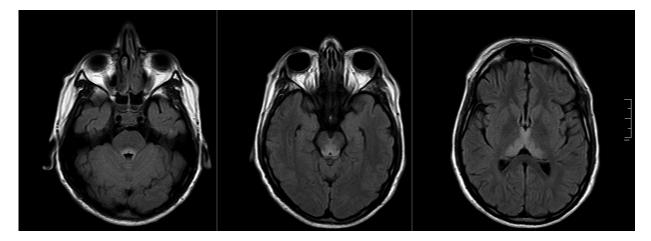
#### Consideraciones éticas

El paciente fue atendido en el Hospital Universitario Los Comuneros y, para la publicación de su caso, se obtuvo su consentimiento después de explicarle el propósito del reporte; durante el proceso, se garantizó la confidencialidad de la información y no se lo expuso a tratamientos experimentales.

#### Discusión

El CMV es uno de los microorganismos más importantes causantes de infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos antes de la introducción de la HAART para la infección por el HIV. Con la introducción de este tratamiento, se mejoraron sustancialmente las tasas de morbimortalidad relacionadas con la infección, así como la calidad de vida de estos pacientes y, consecuentemente, se logró la disminución de la replicación y de la incidencia de la comorbilidad por CMV (8,9).

Hoy se sabe que los individuos portadores del HIV seropositivos para CMV desarrollan 2,5 veces más rápidamente el sida que aquellos seronegativos para el CMV. La detección del CMV en sangre o en las secreciones corporales constituye un factor de riesgo independiente para la progresión de la enfermedad, lo cual no ha cambiado a pesar de la introducción de la HAART (8).



**Figura 1.** Secuencias *flair* en el plano axial que demuestran hiperintensidades periacueductales en la región medial de ambos tálamos, características del síndrome de Wernicke Flair: *fluid-attenuated inversion recovery* 

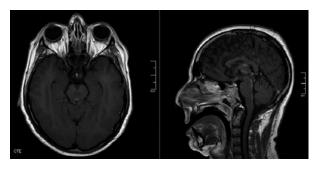
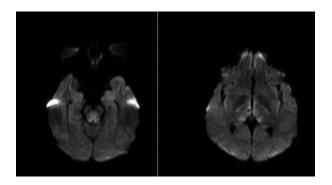


Figura 2. Secuencias *spin echo* (SE) con información ponderada T1 con contraste en los planos axial y sagital, que demuestran realce con el medio de contraste paramagnético en la región periacueductal



**Figura 3.** Secuencias de difusión DWI en el plano axial que muestran aumento de la señal en la región periacueductal y el contorno medial de ambos tálamos

DWI: diffusion-weighted magnetic resonance imaging

Los mecanismos por los cuales la infección con el CMV puede comportarse como un factor de riesgo independiente de la progresión de la enfermedad y de la muerte en pacientes positivos para el HIV, aún no están completamente esclarecidos. Se ha sugerido que el CMV se comporta como un factor activador de los retrovirus que se encuentran en estado de latencia, pues ello aumenta indirectamente la cantidad de virus con capacidad de replicación. También, se ha establecido un posible deterioro en la funcionalidad de los linfocitos CD4+como consecuencia de la viremia por CMV, a pesar de la aparente buena reacción terapéutica a la HAART, medida por los conteos de este tipo de linfocitos (8).

Aún no se ha establecido si los pacientes seropositivos con viremia por CMV que están recibiendo la HAART deben recibir tratamiento específico contra el CMV, dada la estrecha relación entre esta infección y el empeoramiento del curso de la infección por HIV, a pesar del uso de la mencionada terapia artirretroviral (8). En la población general, la prevalencia de anticuerpos para CMV oscila entre 40 y 100 % (10). Aunque se ha reportado que las infecciones son de resolución espontánea, también se han informado manifestaciones graves. En la revisión de Rafailidis, *et al.*, se reportaron 290 pacientes, y el principal sitio de infección fue el tubo digestivo, seguido del sistema nervioso central; 56 pacientes tuvieron infecciones graves con signos de mielitis, encefalitis, meningoencefalitis o radiculopatía (11).

En el 95 % de los pacientes homosexuales y positivos para HIV, se ha documentado la presencia de anticuerpos contra el CMV; el mayor riesgo de reactivación se ha determinado en aquellos con conteos de CD4 menores de 100 células/mm³ (11). En los estudios *post mortem*, se ha descrito la infección por CMV en 15 a 25 % de los pacientes con sida, pero las manifestaciones clínicas se desarrollaron en menos del 1 % (12,13).

En el estudio realizado entre 1965 y 1995, Arribas, et al., documentaron los casos de 573 pacientes con diagnóstico definitivo de encefalitis por CMV (hallazgo de células citomegálicas en el tejido cerebral), y encontraron que 85 % de ellos tenía coinfección por HIV, en tanto que en el 12 % la inmunosupresión respondía a otras causas; en los pacientes inmunocompetentes (3 % en este estudio), los síntomas principales fueron la fiebre y la cefalea (14).

Entre las condiciones neurológicas debidas al CMV en pacientes con HIV, se han encontrado las siguientes: retinitis en 20 %, encefalitis en 54 %, polirradiculopatía en 54 %, romboencefalitis y ventriculoencefalitis en 1,8 % y neuropatía multifocal en 20 % (15,16). Es común encontrar enfermedades extraneuronales con afectación de la retina y del tubo digestivo, complicaciones que ocurren con bajos conteos de CD4 (15-19).

Dado el variado espectro de síntomas neurológicos en la coinfección, entre los diagnósticos diferenciales deben tenerse en cuenta la demencia por HIV, el síndrome de Guillain-Barré, la tuberculosis cerebral, la toxoplasmosis y el linfoma (15,20). Debe señalarse que los diagnósticos no son excluyentes, y que es común el hallazgo de estas enfermedades en el momento en que se detecta la infección por CMV. En este sentido, en algunas series de casos se ha descrito la coinfección por toxoplasma en 26 % de los casos, el linfoma en 9 % y la infección por herpes simple en 5 % (14).

#### Hallazgos histopatológicos

Entre los hallazgos histopatológicos descritos en el sistema nervioso central por efecto del CMV, está la presencia de células citomegálicas aisladas, nódulos microgliales y necrosis parenquimatosa focal. En la forma micronodular de la infección por CMV, solo el 10 % de estos nódulos contiene cuerpos de inclusión virales, los cuales pueden encontrarse en neuronas, astrocitos y células endoteliales del cerebro sin inflamación asociada; cuando hay afectación periventricular, pueden observarse zonas con hemorragia (16).

En la polirradiculopatía, se encuentran inclusiones en las células de Schwann, fibroblastos y células multinucleadas, y endarteritis obliterante, así como infartos en la capa de mielina (15,21), pero no se han encontrado cuerpos de inclusión en las motoneuronas (22).

### Análisis citoquímico del líquido cefalorraquídeo y diagnóstico

Los resultados del análisis citoquímico del líquido cefalorraquídeo varían. La ventriculoencefalitis se asocia con pleocitosis, proteinorraquia e hipoglucorraquia en mayor medida que la encefalitis; estos mismos hallazgos pueden encontrarse en pacientes con radiculopatía, en quienes pueden ser más acentuados y simular una meningitis bacteriana. En los pacientes con polirradiculopatía, el predominio en la pleocitosis es de leucocitos polimorfonucleares y, en la ventriculoencefalitis, de mononucleares (13-15,19,23,24).

El diagnóstico se establece con la detección del virus mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el líquido cefalorraquídeo, con una sensibilidad y especificidad mayores del 90 % (25). La identificación del antígeno pp67 en el líquido cefalorraquídeo tiene una sensibilidad del 84,6 % y una especificidad del 100 % (26). El cultivo en líquido cefalorraquídeo tiene una sensibilidad del 18 % y una especificidad del 100 % (26). En todos los pacientes con sospecha de coinfección, se recomiendan la PCR y el cultivo.

#### Manifestaciones clínicas

Entre los síntomas que se presentan en los pacientes que cursan con mielitis, se encuentran la arreflexia ascendente, las parestesias, las hipoestesias y la retención urinaria; hasta el 75 % de los pacientes puede referir adormecimiento simétrico de las extremidades (16). En la neuropatía multifocal, se evidencian simultáneamente síntomas de parestesias en varias localizaciones; los nervios más

afectados son el radial, el cubital, el peroneo y el femoral lateral cutáneo (16). La disfunción sensitiva y motora aguda también puede estar relacionada con la infección y la toxicidad de los análogos de nucleósidos, lo cual debe tenerse en cuenta en los diagnósticos diferenciales (27).

Los síntomas de la encefalitis incluyen mareos y alteraciones de la memoria y el equilibrio; los propios del tallo cerebral son marcha con base amplia, ataxia del tronco y movimientos oculares 'sacádicos'; los propios de afectación periventricular incluyen nistagmo, paresia de los músculos oculares o dificultad para hablar. Como signos clínicos prominentes de la ventriculoencefalitis, se han descrito la parálisis ocular motora y el nistagmo (16).

#### Síndrome de Wernicke-Korsakoff

El de Wernicke-Korsakoff es un síndrome neuropsiquiátrico agudo caracterizado por nistagmo, parálisis ocular motora, y cambios en el estado mental y en la marcha (28), los cuales también se describen en la encefalitis por CMV debido a que ambas condiciones afectan zonas como la sustancia gris periacueductal y el tálamo (29,30). Esto ha llevado al diagnóstico de este síndrome en pacientes con encefalitis por CMV, en quienes en la histopatología se encuentran inclusiones citomegálicas, y no las hemorragias petequiales y la congestión propias del déficit de tiamina (18).

En las cohortes de pacientes con CMV en quienes se ha detectado el síndrome de Wernicke-Korsakoff, la probabilidad de viremia fue mayor y el conteo de CD4, ligeramente menor (18,30). Se han observado alteraciones *post mortem* en el hipocampo, cerca de los cuernos temporales de los ventrículos laterales, en pacientes que no habían desarrollado ventriculoencefalitis y en quienes se detectaron signos de infección por CMV en los núcleos olivares, los cuerpos mamilares y el hipotálamo.

Las manifestaciones extraneuronales del CMV se han reportado con igual frecuencia en pacientes con síndrome de Korsakoff y sin él; la inflamación suprarrenal y la polineuropatía sensitiva fueron más frecuentes en quienes no presentaban el síndrome de Korsakoff (18).

En el estudio publicado por Pirskanen-Matell, et al., en el 2009, se describió una cohorte de pacientes con HIV, en 93 de los cuales se sospechaba encefalitis por CMV; en 48, se confirmó el diagnóstico de encefalitis por CMV mediante PCR en líquido cefalorraquídeo o en los estudios post

mortem; 17 de ellos fueron diagnosticados con síndrome de Korsakoff y 85 % tenía alteración en la marcha. Los pacientes recibían suplementos vitamínicos que incluían vitamina  $B_1$  y ninguno tenía antecedentes de alcoholismo, por lo que no se consideró que la deficiencia de  $B_1$  fuera la causa del síndrome de Wernicke-Korsakoff (18). En los pacientes con HIV en quienes se sospecha este síndrome, además del soporte adecuado con tiamina, deben practicarse RM cerebral y PCR para detectar CMV en el líquido cefalorraquídeo.

La encefalopatía de Wernicke resulta de la deficiencia de vitamina B<sub>1</sub> y, aunque se asocia con el alcoholismo, guarda relación con la presencia de tumores malignos, sida, inflamación crónica, malabsorción y malnutrición. La prevalencia de deficiencia de B<sub>1</sub> en la población con sida es de 23 %, y el primer caso se reportó en 1987 en pacientes tratados con zidovudina. La caquexia y el estado catabólico del HIV se asocian con el desarrollo del síndrome de Wernicke, por lo que se ha recomendado administrar suplemento de tiamina en los pacientes con sida (31).

#### Hallazgos radiológicos

La resonancia magnética es el método de elección para el estudio de la encefalopatía de Wernicke y de la encefalitis por CMV (32). Entre los hallazgos generales en la encefalopatía de Wernicke, se encuentra el realce intenso en la sustancia gris periacueductal, los cuerpos mamilares, el tálamo medial (adyacente al tercer ventrículo) y el hipotálamo (33) (cuadro 3).

Entre los hallazgos de las imágenes en la encefalopatía por CMV se destaca el realce periventricular en las secuencias T1, asociado en ocasiones al realce subependimario con medio de contraste paramagnético; este realce subependimario también se ha descrito en los linfomas y en la ventriculitis de origen bacteriano (23).

Cuando se trata de encefalitis difusa, en cambio, se encuentran lesiones hiperintensas en el hipocampo, el cerebelo, el tallo cerebral y los ganglios basales; la presencia de hiperintensidad en las secuencias T1 puede indicar la transformación hemorrágica que se presenta después de un trasplante de médula ósea o de una trombocitopenia (32).

#### Pronóstico

El diagnóstico de la ventriculoencefalitis tiene mal pronóstico en pacientes inmunocomprometidos y cuando el conteo de CD4 es menor de 100 células/µl. Se ha descrito una supervivencia no mayor de cuatro semanas debido al inicio agudo y, en ocasiones, a la falta de mejoría terapéutica asociada a la resistencia. Se encontró que hasta 56 % de los pacientes con HIV que desarrollan encefalitis estaba en tratamiento con foscarnet o ganciclovir (14); además, pueden encontrarse síntomas de polirradiculopatía antes de la aparición de los síntomas de encefalitis.

#### **Conclusiones**

En este artículo se describe el caso de un paciente con afectación gastrointestinal y ventriculoencefalitis por CMV, con hallazgos clínicos y radiológicos de encefalopatía de Wernicke, en quien la infección se detectó mediante PCR en líquido cefalorraquídeo. Tuvo mejoría de los síntomas neurológicos con el tratamiento con ganciclovir. Esta forma de presentación es poco usual y su diagnóstico se basó en la afectación de áreas periventriculares a causa del CMV en las imágenes de resonancia magnética, así como en el déficit de vitamina B<sub>1</sub>. Los signos clínicos fueron nistagmo, oftalmoplejia, y alteración del estado mental y de la marcha.

Cuadro 3. Hallazgos frecuentes en la encefalopatía de Wernicke (33)

Estudio de imágenes diagnósticas	Hallazgos
TC cerebral RM cerebral	Usualmente es normal.
Secuencias T1	Hipointensidades en sustancia gris periacueductal, cuerpos mamilares, hipotálamo y talamo medial
Secuencias T2	En encefalopatía crónica: atrofia de cuerpos mamilares identificados en cortes sagitales Hiperintensidad alrededor del tercer ventrículo, cuerpos mamilares, hipotálamo y tálamo medial y sustancia gris periacueductal
FLAIR DWI Medicina nuclear: 18F-FDG-PET	Hallazgos similares a los de la secuencia T2 Usualmente, las áreas afectadas presentan restricción a la difusión. Hipometabolismo en diencéfalo, área retroesplenial, sistema límbico y lóbulo temporal medial

TC: tomografía computadorizada; RM: resonancia magnética; FLAIR: fluid-attenuated inversion recovery; DWI: Diffusion-weighted Magnetic Resonance Imaging, PET: positron emission tomography

El paciente cursaba con un cuadro clínico de esofagitis que producía episodios ocasionales de vómito, pero no en una cantidad significativa para generar déficit de vitamina B<sub>1</sub>, y tampoco tenía antecedentes de alcoholismo. Por ello, en los pacientes con HIV que consulten por signos y síntomas indicativos de encefalopatía de Wernicke, se recomienda practicar punción lumbar y PCR para la detección del CMV.

El hecho de haber detectado en la PCR una carga de CMV sérico menor de 500 copias/ml puede deberse a la variación en la sensibilidad de la prueba, con valores reportados de 61 a 100 %, según la que se use. Aunque las cargas elevadas se asocian con la enfermedad, aún no se ha establecido un valor predictivo. De todas maneras, el hallazgo en el líquido cefalorraquídeo y la reacción terapéutica, corroboraron el diagnóstico.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses. No hay relación con terceros que haya podido influir en la elaboración del manuscrito, ni en las conclusiones presentadas.

#### **Financiación**

No hubo financiación para la publicación de este caso o la investigación realizada en torno al tema.

#### Referencias

- Joint United Nations Programme on HIV and AIDS. The GAP Report. Global AIDS Update 2016. Geneva: UNAIDS; 2016.
- Gianella S, Letendre S. Cytomegalovirus and HIV: A dangerous pas de deux. J Infect Dis. 2016;214(Suppl.2): S67-74. https://.doi.org/10.1093/infdis/jiw217
- Springer KL, Weinberg A. Cytomegalovirus infection in the era of HAART: Fewer reactivations and more immunity. J Antimicrob Chemother. 2004;54:582-6. https://doi.org/10. 1093/jac/dkh396
- Barrett L, Stapleton SN, Fudge NJ, Grant MD. Immune resilience in HIV-infected individuals seronegative for cytomegalovirus. AIDS. 2014;28:2045-9. https://doi.org/10. 1097/QAD.00000000000000405
- Gianella S, Anderson CM, Vargas MV, Richman DD, Little SJ, Morris SR, et al. Cytomegalovirus DNA in semen and blood is associated with higher levels of proviral HIV DNA. J Infect Dis. 2013;207:898-902. https://doi.org/10.1093/infdis/ iis777
- Luchsinger V, Vásquez P, Silva M, Bruno MJ, Siches I, Villarroel J, et al. Antigenemia y reacción de polimerasa en cadena en tiempo real en el diagnóstico de enfermedad por citomegalovirus en adultos con virus de inmunodeficiencia adquirida. Rev Chil Infectol. 2015;32:664-71. https://:doi. org/10.4067/S0716-10182015000700008

- Lichtner M, Cicconi P, Vita S, Cozzi-Lepri A, GalliM, Lo Caputo S, et al. Cytomegalovirus coinfection is associated with an increased risk of severe non-AIDS-defining events in a large cohort of HIV-infected patients. J Infect Dis. 2015;211:178-86. https://cioi.org/10.1093/infdis/jiu417
- Deayton JR, Sabin CA, Johnson MA, Emery VC, Wilson P, Griffiths PD. Importance of cytomegalovirus viraemia in risk of disease progression and death in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. Lancet. 2004;363:2116-21. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16500-8
- Sungkanuparph S, Chakriyanuyok T, Butthum B. Antiretroviral therapy in AIDS patients with CMV disease: Impact on the survival and long-term treatment outcome. J Infect. 2008;56:40-3. https://idoi.org/10.1016/j.jinf.2007.10.005
- Collier AC, Meyers JD, Corey L, Murphy VL, Roberts PL, Handsfield HH. Cytomegalovirus infection in homosexual men: Relationship to sexual practices, antibody to human immunodeficiency virus, and cell-mediated immunity. Am J Med. 1987;82:593-601.
- Valdés CF, Fonseca GC, Capó de la Paz V, Bosch GL, Menéndez VA, Rivera KC, et al. Infección por citomegalovirus en pacientes VIH/SIDA. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2015;31:113-26.
- Gonzáles MF, Davis RL. Neuropathology of acquired immunodeficiency syndrome. Neuropathol Appl Neurobiol. 1988;14:345-63. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1988. tb01138.x
- McCutchan JA. Cytomegalovirus infections of the nervous system in patients with AIDS. Clin Infect Dis. 1995;20:747-54.
- Arribas JR, Storch GA, Clifford DB, Tselis AC. Cytomegalovirus encephalitis. Ann Intern Med. 1996;125:577-87. https://.doi.org/10.7326/0003-4819-125-7-199610010-00008
- 15. Silva CA, Oliveira AC, Vilas-Boas L, Fink MC, Pannuti CS, Vidal JE. Neurologic cytomegalovirus complications in patients with AIDS: Retrospective review of 13 cases and review of the literature. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010;52:305-10. https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000600004
- Anders HJ, Goebel FD. Neurological manifestations of cytomegalovirus infection in the acquired immunodeficiency syndrome. Int J STD AIDS. 1999;10:151-9. https://doi.org/10. 1258/0956462991913817
- Manzardo C, Del Mar Ortega M, Sued O, García F, Moreno A, Miro JM. Central nervous system opportunistic infections in developed countries in the highly active antiretroviral therapy era. J Neurovirol. 2005;11(Suppl.3):72-82. https:// dx.doi.org/10.1080/13550280500513846
- Drew WL. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. Clin Infect Dis. 1992;14:608-15.
- Pirskanen-Matell R, Grutzmeier S, Nennesmo I, Sandstrom E, Ehrnst A. Impairment of short-term memory and Korsakoff syndrome are common in AIDS patients with cytomegalovirus encephalitis. Eur J Neurol. 2009;16:48-53. https://dx.doi.org/10.1111/j.1468-1331.2008.02337.x
- Miller RF, Fox JD, Thomas P, Waite JC, Sharvell Y, Gazzard BG, et al. Acute lumbosacral polyradiculopathy due to cytomegalovirus in advanced HIV disease: CSF findings in 17 patients. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1996;61:456-60. https://.doi.org/10.1136/jnnp.61.5.456

- 21. Singh BM, Levine S, Yarrish RL, Hyland MJ, Jeanty D, Wormser GP. Spinal cord syndromes in the acquired immune deficiency syndrome. Acta Neurol Scand. 1986;73:590-8. https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1986.tb04605.x
- Grafe MR, Wiley CA. Spinal cord and peripheral nerve pathology in AIDS: The roles of cytomegalovirus and human immunodeficiency virus. Ann Neurol. 1989;25:561-6.
- Kalayjian RC, Cohen ML, Bonomo RA, Flanigan TP.
   Cytomegalovirus ventriculoencephalitis in AIDS: A syndrome
   with distinct clinical and pathologic features. Medicine
   (Baltimore). 1993;72:67-77.
- McCutchan JA. Clinical impact of cytomegalovirus infections of the nervous system in patients with AIDS. Clin Infect Dis. 1995;21(Suppl. 2):S196-201.
- 25. Bestetti A, Pierotti C, Terreni M, Zappa A, Vago L, Lazzarin A, et al. Comparison of three nucleic acid amplification assays of cerebrospinal fluid for diagnosis of cytomegalovirus encephalitis. J Clin Microbiol. 2001;39:1148-51. https://doi.org/10.1128/JCM.39.3.1148-1151.2001
- 26. Zhang F, Tetali S, Wang XP, Kaplan MH, Cromme FV, Ginocchio CC. Detection of human cytomegalovirus pp67 late gene transcripts in cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus type 1-infected patients by nucleic acid sequence-based amplification. J Clin Microbiol. 2000; 38:1920-5.

- Dalakas MC, Cupler EJ. Neuropathies in HIV infection. Baillieres Clin Neurol. 1996;5:199-218. https://doi.org/10. 1016/S1474-4422(07)70104-7
- Sechi G, Serra A. Wernicke's encephalopathy: New clinical settings and recent advances in diagnosis and management. Lancet Neurol. 2007;6:442-55. https://doi. org/10.1016/S1474-4422(07)70104-7
- Victor M, Adams RD, Collins GH. The Wernicke-Korsakoff syndrome. A clinical and pathological study of 245 patients, 82 with post-mortem examinations. Contemp Neurol Ser. 1971;7:1-206.
- Torgovnick J, Arsura EL, Lala D. Cytomegalovirus ventriculoencephalitis presenting as a Wernicke's encephalopathylike syndrome. Neurology. 2000;55:1910-3.
- LarsenTR, Dragu D, Williams M. Wernicke's ence-phalopathy: An unusual consequence of the acquired immune deficiency syndrome-case report and literature review. Case Rep Med. 2013;2013:709474. https://doi.org/10.1155/2013/709474
- Maschke M, Kastrup O, Diener HC. CNS manifestations of cytomegalovirus infections: Diagnosis and treatment. CNS Drugs. 2002;16:303-15.
- Osborn AG, Salzman KL, Jhaveri MD, Barkovich AJ. Diagnostic Imaging Brain. 3rd edition. Canada: Elsevier; 2005. p. 886-985.

#### ARTÍCULO ORIGINAL

### Sensibilidad *in vitro* de cepas cubanas de *Aspergillus* spp. de origen clínico y ambiental

Javier L. San Juan<sup>1</sup>, Carlos M. Fernández<sup>1</sup>, Michel Almaguer<sup>2</sup>, Mayda R. Perurena<sup>1</sup>, Gerardo F. Martínez<sup>1</sup>, Rosario E. Velar<sup>1</sup>, María T. Illnait<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Laboratorio Nacional de Referencia de Micología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", La Habana, Cuba
- <sup>2</sup> Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba

**Introducción.** En Cuba se desconoce el comportamiento de la sensibilidad de *Aspergillus* spp. a los antifúngicos recomendados para el tratamiento de la aspergilosis: la anfotericina B, el itraconazol, el voriconazol y las equinocandinas. La influencia del ambiente puede condicionar la aparición de resistencia en estos microorganismos.

**Objetivo.** Evaluar la sensibilidad *in vitro* de cepas de *Aspergillus* spp. a la anfotericina B, el itraconazol y el voriconazol, y la relación de los patrones de sensibilidad con su origen.

**Materiales y métodos.** Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas de la anfotericina B, el itraconazol y el voriconazol para 60 cepas de *Aspergillus* spp. de origen clínico y ambiental mediante el método M38-A2 del *Clinical and Laboratory Standard Institute*.

**Resultados.** Se encontraron 21 cepas resistentes a la anfotericina B (principalmente en muestras clínicas y ambientes hospitalarios) y tres cepas resistentes al itraconazol (en ambientes interiores y exteriores no hospitalarios). No se hallaron cepas resistentes al voriconazol. No se encontró relación entre el origen de las cepas y su sensibilidad.

**Conclusiones.** Se sugiere la posible existencia de factores ambientales o interacciones con genotipos resistentes que pueden dar origen a fenotipos resistentes en Cuba. Este es el primer reporte del país de cepas de *Aspergillus* spp. resistentes *in vitro*. Los resultados ameritan ampliar el estudio para incluir análisis moleculares y filogenéticos.

**Palabras clave:** *Aspergillus*; farmacorresistencia fúngica; anfotericina B; itraconazol; voriconazol. doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3447

#### In vitro susceptibility of Cuban Aspergillus spp. strains of clinical and environmental origin

**Introduction:** The behavior of antifungal susceptibility of *Aspergillus* spp. in Cuba remains unknown. The antifungals recommended to treat aspergillosis are amphotericin B, itraconazole, voriconazole and echinocandins. The influence of the environment may set off the emergence of drug-resistance in these microorganisms.

**Objective:** To evaluate *in vitro* susceptibility of *Aspergillus* spp. strains to amphotericin B, itraconazole and voriconazol, and the relationship between susceptibility patterns and their origin.

**Materials and methods:** Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, itraconazole and voriconazole were determined for 60 *Aspergillus* spp. strains of clinical and environmental origin using the M38-A2 method of the Clinical and Laboratory Standards Institute.

**Results:** We found 21 amphotericin B resistant strains (mainly from clinical samples and hospital environments), as well as three itraconazole resistant strains (from non-hospital outdoor and indoor environments). No voriconazole resistance was found. No relationship was found between strain origin and susceptibility.

**Conclusions:** Results suggest the possible existence of environmental factors or interactions with resistant genotypes which may give rise to resistant phenotypes in our country. This is the first report of *in vitro Aspergillus* spp. resistant strains in Cuba. These studies should be broadened and include molecular and phylogenetic analyses.

**Key words:** Aspergillus; drug resistance, fungal; amphotericin B; itraconazole; voriconazole.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3447

#### Contribución de los autores:

Javier L. San Juan y Carlos M. Fernández: desarrollo experimental de la investigación, análisis e interpretación de los datos y redacción del manuscrito

Michel Almaguer: desarrollo experimental de la investigación y proveedor de las cepas evaluadas

Mayda R. Perurena y Gerardo F. Martínez: interpretación de los datos y asesoría en la redacción del manuscrito

Rosario E. Velar: desarrollo experimental de la investigación

María T. Illnait: asesoría en el diseño experimental y en la redacción del manuscrito

El género Aspergillus es probablemente el taxón fúngico de mayor distribución en el mundo por la fácil diseminación de sus esporas y por la amplia gama de sustratos que puede degradar (1).

La interacción con estos microorganismos puede representar un riesgo para la salud humana por la potencial patogenia y la toxicidad que presentan algunas especies. Las infecciones causadas por *Aspergillus* spp. se manifiestan de muchas maneras, desde formas no invasivas, como la otomicosis, las queratitis fúngicas, la aspergilosis broncopulmonar alérgica y los aspergilomas, hasta infecciones invasivas con posible diseminación a diferentes sistemas de órganos (2).

Entre los principales antifúngicos que se utilizan para el tratamiento contra la infección por *Aspergillus* spp., están los triazoles (fundamentalmente, el itraconazol y el voriconazol), la anfotericina B y las equinocandinas (3). En las últimas décadas, se ha observado un incremento en la aparición de cepas resistentes a los antifúngicos, fundamentalmente de *A. fumigatus* (4). Sobre *Aspergillus* spp. se han realizado múltiples investigaciones para determinar la sensibilidad *in vitro* de sus especies y los factores ambientales que influyen sobre este patrón (5,6). En Cuba no existe información sobre el tema en el ámbito clínico ni en estudios de micobiota ambiental.

Esta es la primera investigación cubana que pretende evaluar la reacción frente a tres de los principales antifúngicos empleados para tratar la aspergilosis en grupos de especies de *Aspergillus* con origen clínico y ambiental.

#### Materiales y métodos

#### Cepas

Se evaluaron 60 cepas pertenecientes al género Aspergillus organizadas en tres grupos, según su origen: grupo 1 (G1), formado por 20 cepas aisladas de ambientes exteriores e interiores no hospitalarios, proporcionadas por la Colección de Cultivos Microbianos de la Facultad de Biología (CCMFB) del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana; grupo 2 (G2), formado por 20 cepas aisladas de ambientes

Correspondencia:

Carlos M. Fernández, Laboratorio Nacional de Referencia de Micología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", km 6 ½, Autopista "Novia del Mediodía", La Lisa, La Habana, Cuba Teléfono: (537) 255 3524

cfandreu@ipk.sld.cu

Recibido: 10/08/16; aceptado: 05/12/16

hospitalarios del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) y del Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas (CIMEQ), y grupo 3 (G3), constituido por 20 cepas aisladas de muestras clínicas provistas por el Laboratorio de Microbiología del Hospital Militar "Luis Díaz Soto", el Laboratorio de Microbiología del CIMEQ y la Colección de Hongos Patógenos del IPK.

Todas las cepas estaban clasificadas según los criterios de identificación de Barnet, et al. (7), Klich, et al. (8), y de Hoog, et al. (9). La distribución según especie fue la siguiente: 19 de A. fumigatus, 20 de A. flavus, 20 de A. niger y una de A. terreus. A todas las cepas se les asignó un código específico, diferente a su original, en aras de homogenizar la nomenclatura.

#### Cepas de control

Como cepas de control se utilizaron *Candida krusei* ATCC® 6258 y *C. parapsilosis* ATCC® 22019. Los valores de sensibilidad se determinaron dentro de los límites establecidos por el método M38-A2 del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (10).

#### Sensibilidad a los antifúngicos

La determinación de la sensibilidad a la anfotericina B y al itraconazol se hizo con el método de microdilución M38-A2 del CLSI (10). Las soluciones "madre" de cada antifúngico se prepararon con dimetilsulfóxido (DMSO). Las diluciones finales (1:50) se hicieron en el medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich; USA) usando ácido 3- [N-morfolino] propanosulfónico (MOPS) (Sigma-Aldrich; USA) como solución tampón; el pH se ajustó a un valor de 7,0 ± 0.1. Posteriormente, se distribuyeron 100 µl de las soluciones de los antifúngicos en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Cellstar®). Los inóculos se ajustaron a una concentración de 0,4-5 x 10<sup>4</sup> conidios por ml mediante conteo en cámara de Neubauer, y se dispensaron 100 µl en los pocillos con los antifúngicos. En cada placa se tuvieron en cuenta un control negativo (medio de cultivo sin antifúngico ni inóculo) y un control de crecimiento (medio con disolvente e inóculo).

Las placas se incubaron a 35 °C durante 48 horas. Los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) para la anfotericina B y para el itraconazol, se establecieron como el menor valor de concentración en el que se observó el 100 % de inhibición del crecimiento y no se observó efecto de arrastre (10). Se determinó la CIM del voriconazol frente a

las cepas que mostraron resistencia a la anfotericina B o al itraconazol y, para ello, se emplearon tiras de Etest® (bioMérieux; Francia) según la metodología descrita por el fabricante. La preparación y la estandarización del inóculo fueron las mismas que las utilizadas en el procedimiento de microdilución. Se empleó el medio RPMI-1640 con agar como medio de cultivo. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C (11).

La lectura de los datos se hizo siguiendo las indicaciones del fabricante. Los valores de sensibilidad del Etest® diferentes de los intervalos establecidos en el método de referencia, se aproximaron a la concentración inmediatamente superior empleada por el método del CLSI para facilitar su correcta interpretación categórica. Todos los antifúngicos empleados fueron suministrados por la casa comercial Sigma-Aldrich.

#### Interpretación de los datos y análisis estadístico

Para los tres antifúngicos, se consideraron sensibles las cepas con valores de CIM de 1  $\mu$ g/ml o menores, con sensibilidad intermedia, aquellas con una CIM de 2  $\mu$ g/ml, y como resistentes, aquellas con una CIM de 4  $\mu$ g/ml o menos (10).

Los datos de concentración de la anfotericina B y el itraconazol se transformaron a escala para su análisis estadístico (transformación logarítmica). Se calcularon las medias geométricas de los tres antifúngicos para cada grupo según su origen, y para las especies *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger* frente a la anfotericina B y el itraconazol.

Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) para comparar las medias de CIM de los dos antifúngicos en todas las especies evaluadas, y las medias de los valores de CIM de los grupos según el origen. También, se determinó la relación entre el grado de sensibilidad a los dos antifúngicos y el origen de las cepas mediante un test de  $\chi^2$  de Fischer. El voriconazol se excluyó de los ANOVA dado que para este se utiliza un método de evaluación diferente al del CLSI. En todos los análisis se empleó un alfa de 0,05. Los datos se analizaron con el programa estadístico GraphPad Prism, versión 6.01.

#### Resultados

En el cuadro 1 se presentan todas las cepas evaluadas mediante el ensayo de microdilución frente a la anfotericina B y el itraconazol. Se evaluó una cepa de *A. terreus*, pero esta no se tuvo en cuenta en los análisis de varianza por no ser estadísticamente representativa.

La media geométrica de la CIM de la anfotericina B, en el G1, fue de 2,14 µg/ml, en el G2, de 1,80 µg/ml, y en el G3, de 1,19 µg/ml. La media geométrica de la CIM del itraconazol, en el G1, fue de 0,73 µg/ml, en el G2, de 0,52 µg/ml, y en el G3, de 0,13 µg/ml. Para A. fumigatus, la media geométrica de la CIM fue de 0,90 para la anfotericina B y de 0,26 para el itraconazol; para A. flavus, fue de 2,73 para la anfotericina B y de 0,22 para el itraconazol; y para A. niger, fue de 1,62 para la anfotericina B y de 0,84 para el itraconazol.

Se detectaron 21 cepas resistentes a la anfotericina B y tres cepas resistentes al itraconazol. En el G1, 7 (11,67 % del total) cepas mostraron valores de CIM para la anfotericina B correspondientes al criterio de resistencia; en el G2, se detectaron 8 (13,33 % del total) cepas y, en el G3, 6 (10 % del total). Solo se observaron tres (5 % del total) cepas resistentes al itraconazol en el G1. La especie con mayor número de cepas resistentes a la anfotericina B fue *A. flavus* (21,67 %), seguida por *A. niger* (6,67 %) y *A. fumigatus* (5 %). *Aspergillus niger* resultó ser la única especie (5 %) resistente al itraconazol.

En la figura 1 se presenta la distribución de las cepas según especie y patrón de sensibilidad. El ANOVA mostró diferencias significativas (p<0,05) en las medias de las muestras entre especies para los antifúngicos evaluados mediante microdilución (anfotericina B: p=0,0069; itraconazol: p=0,0016). El ANOVA no arrojó diferencias significativas (p<0,05) en las medias de las muestras entre los grupos frente a la anfotericina B (p=0,26), pero fue estadísticamente significativo frente al itraconazol (p=0,0001).

En la figura 2 se presenta la distribución de las cepas según el patrón de sensibilidad y los grupos definidos según su origen. Mediante el test de  $\chi^2$  de Fischer, se estableció la independencia entre las variables del grado de sensibilidad a la anfotericina B y el origen de las cepas. No se pudo hacer el test de  $\chi^2$  para el itraconazol debido al tamaño de la muestra y a la ausencia de cepas en las categorías de la variable de grado de sensibilidad.

Los valores de la CIM del voriconazol se presentan en el cuadro 2. La media geométrica de la CIM para este antifúngico fue de 0,54 µg/ml en el G1, de 0,55 µg/ml en el G2, y de 0,14 µg/m en el G3. La cepa de *A. terreus* no se incluyó en el cálculo de esta media geométrica en el G3. No se hallaron cepas resistentes a este antifúngico.

**Cuadro 1.** Valores de concentración mínima inhibitoria (CIM) de la anfotericina B (AMB) y del itraconazol (ITZ) para las cepas evaluadas por el método de microdilución. Los grupos corresponden al origen de la cepa. G1: ambientes interiores y exteriores no hospitalarios; G2: ambiente hospitalario; G3: muestras clínicas.

Grupos	Aspergillus fumigatus (código de la cepa)		ITZ <sup>ciM</sup> (µg/ml)	Aspergillus flavus (código de la cepa)	AMB <sup>ciM</sup> (μg/ml)	ITZ <sup>CIM</sup> (μg/ml)	Aspergillus niger (código de la cepa)	AMB <sup>CIM</sup> (μg/ml)	ITZ <sup>ciм</sup> (µg/ml)	Aspergillus terreus (código de la cepa)	AMB <sup>CIM</sup> (μg/ml)	ITZ <sup>CIM</sup> (μg/ml)
G1	JF01	1,0	0,5	JF00	4,0	0,5	JF05	1,0	0,25			
	JF02	0,5	0,5	JF04	8,0	0,5	JF07	2,0	2,0			
	JF03	0,5	0,125	JF06	>16,0	0,5	JF08	1,0	0,25			
	JF10	4,0	1,0	JF11	8,0	0,25	JF15	2,0	>16,0			
	JF12	2,0	0,5	JF14	4,0	0,5	JF16	2,0	>16,0			
	JF13	0,5	0,0625	JF18	8,0	1,0	JF17	2,0	>16,0			
	JF19	1,0	0,5									
	JF23	2,0	0,5									
G2	JJ1	4,0	1,0	JJ11	8,0	0,25	JAI	0,5	1,0			
	JJ10	2,0	0,25	JJ2	0,25	2,0	JAII	2,0	0,5			
	JJ4	1,0	0,125	JJ3	0,25	1,0	JAIII	1,0	1,0			
				JJ8	4,0	0,25	JAIV	1,0	2,0			
				JM10	8,0	0,25	JM01	1,0	1,0			
							JM02	1,0	1,0			
							JM03	4,0	1,0			
							JM05	4,0	0,125			
							JM06	2,0	1,0			
							JM07	4,0	0,25			
							JM08	4,0	0,25			
							JM09	2,0	0,25			
G3	JL04	0,5	0,125	JL13	0,25	0,0625	JL01	1,0	0,5	JL16	>16,0	0,25
	JL05	0,25	0,0625	JL14	2,0	0,0625	JL12	1,0	0,0625			
	JL06	0,125	0,125	JL17	8,0	0,125						
	JL07	0,25	0,25	JL18	0,5	0,0625						
	JL08	4,0	0,5	JL19	4,0	0,125						
	JL09	0,5	0,5	JL23	4,0	0,0625						
	JL05	1,0	0,0625	JL24	0,5	0,0625						
	JL03	1,0	0,25	JL25	1,0	0,0625						
				JL26	>16,0	0,125						

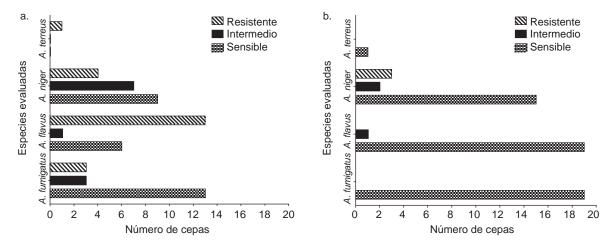


Figura 1. Distribución de las cepas evaluadas mediante el ensayo de microdilución (M38-A2) según la especie y el patrón de sensibilidad a la anfotericina B (AMB) (a) y al itraconazol (ITZ) (b)

#### Discusión

En el estudio se evidenció un grado variable de reacción a la anfotericina B; sin embargo, en el análisis estadístico de la relación entre el origen ambiental de las cepas y sus patrones de sensibilidad a este antifúngico, no se pudo confirmar la hipótesis. Este polieno es el antifúngico de primera línea para el tratamiento de las micosis graves y su empleo

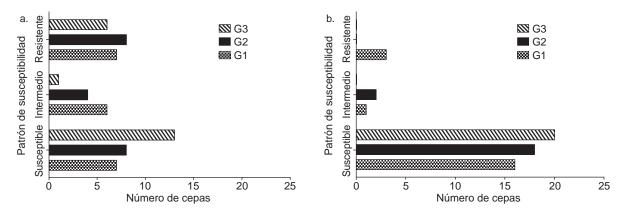


Figura 2. Distribución de las cepas evaluadas mediante el ensayo de microdilución (M38-A2) según su patrón de sensibilidad y el origen del aislamiento. a) frente a la anfotericina B (AMB); b) frente al itraconazol (ITZ). G1: ambientes interiores y exteriores no hospitalarios; G2: ambientes hospitalarios; G3: muestras clínicas

Cuadro 2. Valores de concentración mínima inhibitoria (CIM) del voriconazol (VCZ) para las cepas evaluadas por Etest<sup>®</sup>. Los grupos corresponden al origen de las cepas. G1: ambientes interiores y exteriores no hospitalarios; G2: ambientes hospitalarios; G3: muestras clínicas

Grupos	Aspergillus fumigatus (código de la cepa)	VCZ <sup>ciM</sup> (µg/ml)	Aspergillus flavus (código de la cepa)		Aspergillus niger (código de la cepa)	VCZ <sup>ciM</sup> (µg/ml)	Aspergillus terreus (código de la cepa)	VCZ <sup>c™</sup> (µg/ml)
G1	JF10	0,125	JF00	0,25	JF15	1,0		
			JF04	1,0	JF16	1,0		
			JF06	0,25	JF17	2,0		
			JF11	0,25				
			JF14	0,5				
			JF18	1,0				
G2			JJ11	1,0	JM03	1,0		
			JJ8	0,25	JM05	1,0		
			JM10	0,25	JM07	0,5		
					JM08	0,5		
G3	JL08	0,25	JL17	0,25			JL16	0.75
		,	JL19	0,125				•
			JL23	0,125				
			JL26	0,0625				

está generalizado en la mayoría de los hospitales, lo cual supone una problemática cuya verdadera dimensión no se conoce, pues la presión selectiva en estos ambientes podría contribuir a la aparición de fenotipos resistentes (12).

Afortunadamente, la resistencia a este antifúngico es poco frecuente y posiblemente esté asociada a bajos niveles de ergosterol en la membrana celular, lo que conlleva una menor acción del fármaco (13), o a la presencia de mutaciones en el gen *erg*3 que originan la inactivación de la 5,6-esterol desaturasa, una enzima que participa en la ruta de biosíntesis del ergosterol y genera esteroles anormales cuando se ve afectada. Asimismo, existen especies de *Aspergillus* capaces de producir enzimas con actividad reductora, que disminuyen el efecto oxidativo de la anfotericina B en el metabolismo fúngico (14).

Aspergillus terreus es una especie que ha surgido como patógeno oportunista capaz de causar aspergilosis pulmonar, onicomicosis y queratomicosis, entre otras enfermedades, y ha suscitado especial atención por su resistencia natural in vitro e in vivo (15). En 2009, Lars-Flörl, et al. (16), evaluaron el comportamiento de 79 cepas de A. terreus frente a nueve agentes antifúngicos. La media geométrica de los valores de CIM obtenidos para la anfotericina B fue de 1,77 µg/ml (16). Aunque en el presente estudio solo se encontró una cepa perteneciente a esta especie, esta mostró la máxima CIM registrada para este antifúngico (>16 µg/ml), comparable con muchas de las cepas analizadas por Lars-Flörl, et al. Si se supera el número de aislamientos de esta especie, se podría confirmar con mayor certeza que su resistencia natural a la anfotericina B no es un fenotipo poco común.

La distribución de especies pudo influir en los datos de los grupos. El análisis de varianza confirmó la existencia de diferencias significativas entre los valores de CIM para las diferentes especies evaluadas (figura 1). En el estudio, el mayor número de cepas resistentes a la anfotericina B se concentró en A. flavus, con 21,67 % (13 cepas) del total, y esta fue la especie con la mayor media geométrica (2.73), Según Krishnan, et al., la resistencia a este antifúngico en A. flavus es frecuente (17), y Seo, et al., plantean que dicho fenómeno puede deberse a alteraciones en las concentraciones de beta-1.3 glucano y de los complejos proteicos de la pared celular de esta especie, que disminuyen la interacción de la anfotericina B con la membrana plasmática (18).

Cuatro (6,67 %) cepas de *A. niger* y solo tres (5 %) cepas de *A. fumigatus*, fueron resistentes a la anfotericina B, resultados que coinciden con los de varios estudios (19-21).

En estudios sobre aeromicota en Cuba, se ha evidenciado que la especie *A. flavus* es la de mayor predominio entre las potencialmente patógenas (22,23). Infortunadamente, no se conoce con precisión la situación real de las infecciones causadas por *Aspergillus* spp. en nuestro país, lo que genera incertidumbre sobre la prevalencia de esta especie como causante de infección y el subsecuente problema terapéutico que puede generar.

Es importante tener en cuenta que el proceso de identificación de las especies se hizo mediante los métodos convencionales basados en el análisis de las características culturales y de la micromorfología. Esto constituye un sesgo para la clasificación taxonómica por las diferentes modificaciones que ha sufrido la sistemática de hongos en las últimas décadas con el apoyo de las técnicas de identificación molecular. Existe la posibilidad de que algunas de estas cepas pertenezcan a otras especies clasificadas en las diversas secciones establecidas para el género Aspergillus, las cuales son imposibles de determinar mediante la metodología convencional. Estas especies 'crípticas', como se denominan, tienen patrones de sensibilidad categorizados como resistentes a la mayoría de los antifúngicos empleados en el ámbito clínico (24) y podrían ser la causa de los perfiles de sensibilidad registrados en este trabajo.

Solo se encontraron tres cepas resistentes al itraconazol (>16 µg/ml) de la especie *A. niger* en el grupo de ambientes interiores y exteriores no hospitalarios. En diversos estudios a nivel internacional, se comenta sobre la resistencia de esta especie al antifúngico (15,25,26). Tokarzewski, *et al.*, en un grupo de 10 cepas de *A. niger*, obtuvieron valores de  $\mathrm{CIM}_{90}$  frente a este antifúngico de hasta 8 µg/ml mediante el método M38-A, y cinco cepas clasificadas como resistentes, según lo establecido por el CLSI (27). Asimismo, Gheith, *et al.*, hallaron valores elevados (2 mg/l) de la  $\mathrm{CIM}_{90}$  del itraconazol, en 17 cepas de *A. niger* aisladas de pacientes con enfermedades hematológicas en Túnez (21).

La evaluación del voriconazol no reveló cepas resistentes; sin embargo, una de ellas se clasificó como de sensibilidad intermedia, y ocho sensibles presentaron el valor extremo de su categoría. Los valores de la CIM del voriconazol fueron similares a los reportados por Pfaller, *et al.* (28). Este antifúngico actúa, no solo sobre la 14α-esterol demetilasa, enzima diana de la mayoría de los azoles, sino también, sobre la 24-metileno dihidro-lanosteroldemetilasa, otra enzima de la ruta biosintética del ergosterol (29), lo cual podría explicar su mejor efecto en comparación con otros antifúngicos de su misma familia farmacológica, y constituye otra prueba de su potencial terapéutico.

Uno de los nuevos grupos farmacológicos en el tratamiento de la aspergilosis es el de las equinocandinas, moléculas que actúan como inhibidores de la beta-1,3-D-glucano sintasa y afectan indirectamente la incorporación de los beta-1,3-D-glucanos a la pared celular de los hongos.

En el género Aspergillus, estos polisacáridos se concentran fundamentalmente en la pared de la región apical de la hifa y no en el resto del micelio y, por lo tanto, la actividad del fármaco influye sobre la velocidad del crecimiento fúngico, pero no sobre otros aspectos fisiológicos (30). La evaluación de la sensibilidad in vitro de estos antifúngicos es compleja debido al llamado efecto de arrastre (trailing effect) que impide establecer de forma precisa la CIM, por lo que en su lugar se utiliza la concentración efectiva mínima (CEM) como un concepto más adecuado para la interpretación de su actividad antifúngica (10,31).

Por falta de disponibilidad, en este trabajo no se pudieron evaluar la caspofungina, la anidulafungina ni la micafungina; sin embargo, existen diversos estudios a nivel internacional con interesantes resultados. En 2011, Lockhart, et al., publicaron un estudio en el que evaluaron la sensibilidad de 288 aislamientos de *Aspergillus* spp. a estas tres

equinocandinas y ninguna de las CEM<sub>90</sub> para *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger* sobrepasaron el valor de 0,06 μg/ml, en tanto que solamente *A. terreus* mostró un valor de 0,5 μg/ml para la caspofungina (32). En un estudio anterior, Messer, *et al.*, también encontraron una buena actividad de la caspofungina y la anidulafungina frente a 49 aislamientos de *A. fumigatus*, con valores de CEM<sub>90</sub> de 0,12 y 0,008 μg/ml, respectivamente (33).

En el presente estudio, no se comprobó la existencia de una relación entre el origen ambiental de las cepas y su patrón de sensibilidad al itraconazol (figura 2). Sin embargo, las cepas resistentes a este antifúngico se concentraron en el G1 (5 %) con la mayor media geométrica (0,84), un hecho interesante dado que son cepas que provienen de ambientes en los cuales los azoles no tienen uso clínico.

En países europeos y asiáticos, se ha observado que muchas de las cepas de *A. fumigatus* resistente a azoles son frecuentes en campos de cultivo o zonas donde el uso agrícola de triazoles es habitual, o en pacientes que nunca han sido tratados con antifúngicos pero tienen un vínculo estrecho con este tipo de ambientes. El tebuconazol, el propiconazol, el protioconazol, el tetraconazol, el metconazol y el epoxiconazol, son algunos de los fungicidas inhibidores de la desmetilación que a menudo se emplean para la protección contra agentes fitopatógenos (34).

Pham, et al., señalaron que estos compuestos tienen una naturaleza homóloga con los triazoles de uso clínico, y que los microorganismos están expuestos con mayor frecuencia a ellos, lo cual facilita que ocurran mutaciones y que estas se propaguen (4). En los estudios de Faria-Ramos, et al., se emplearon tres cepas de A. fumigatus sometidas a incrementos de procloraz, un azol usado ampliamente en la agricultura; posteriormente, analizaron su sensibilidad al itraconazol, el voriconazol, el posaconazol y el fluconazol, registrando un incremento en los valores de la CIM para los triazoles de uso clínico, lo cual aportó evidencias sobre este tipo de resistencia adquirida en el entorno natural (35).

En Cuba, se ha descrito la influencia de fenómenos meteorológicos en la diseminación de algunas especies de hongos. En 2006, Lopetegui, *et al.*, propusieron modelos predictivos de la trayectoria de conidios transportados por los vientos de diferentes huracanes (36). Asimismo, en reportes meteorológicos anuales de la región del Caribe, se han registrado tormentas de polvo provenientes de la región del

Sahara, entre los meses de marzo y agosto (37), casualmente, la época en la que se aislaron muchas de estas cepas. Estos datos sugieren la posibilidad de que los microorganismos no sean autóctonos y hayan sido importados de forma natural desde áreas con predominio de fenotipos resistentes, o que sean cepas recombinantes de genotipos endémicos con cepas foráneas resistentes.

Este estudio es una investigación preliminar sobre el comportamiento de los patrones de sensibilidad en cepas cubanas de las especies de *Aspergillus* de mayor interés clínico. Se encontró que la resistencia a los azoles era poco frecuente, lo cual es favorable desde el punto de vista epidemiológico y terapéutico. La resistencia a la anfotericina B, en cambio, fue considerable y ello constituye una alerta. Como parte de futuros proyectos, se pretende aumentar el tamaño de la muestra poblacional para confirmar con mayor precisión estos resultados.

#### Agradecimientos

A los doctores Edel García e Ileana Paneque, por sus contribuciones al desarrollo de este estudio.

#### Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses.

#### **Financiación**

Se obtuvo del Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba.

#### Referencias

- Bennett JW. Aspergillus: A primer for the novice. Med Mycol. 2009;47:5-12. https://doi.org/10.1080/13693780802712515
- Stevens DA. Clinical aspergillosis for basic scientists. Med Mycol. 2009;47:1-4. https://doi.org/10.1080/13693780 802322232
- 3. Patterson TF, Thompson III GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbercht R, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2016:63:1-60. https://doi.org/10.1093/cid/ciw326
- Pham CD, Reiss E, Hagen F, Meis JF, Lockhart SR. Passive surveillance for azole-resistant Aspergillus fumigatus, United States, 2011-2013. Emerg Infect Dis. 2014;20:1498-503. https://doi.org/10.3201/eid2009.140142
- Badiee P, Alborzi A, Moeini M, Haddadi P, Farshad S, Japoni A, et al. Antifungal susceptibility of the Aspergillus species by Etest and CLSI reference methods. Arch Iran Med. 2012;15:429-32.
- Lass-Flörl C, Perkhofer S. In vitro susceptibility-testing in Aspergillus species. Mycoses. 2008;51:437-46. https://doi. org/10.1111/j.1439-0507.2008.01510.x.
- 7. **Barnet HL, Hunter BB.** Illustrated genera of imperfect fungi. Portland: MacMillan Publisher Co.; 1997. p. 218.

- Klich MA, Pitt JI. A laboratory guide to the common Aspergillus species and their 19 teleomorphs. Canberra: CSIRO - Division of Food Processing; 2002. p. 116.
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi. Segunda edición. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht: Universitat Rovira i Virgili, Reus; 2000. p. 442-519.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Document M38-A2; Approved Standard. Second edition. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. p. 52.
- 11. Guinea J, Peláez T, Alcalá L, Bouza E. Correlation between the ETest and the CLSI M38-A microdilution method to determine the activity of amphotericin B, voriconazole, and itraconazole against clinical isolates of Aspergillus fumigatus. Diagn Micr Infec Dis. 2007;57:273-6. https://doi. org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.09.003
- Chakrabarti A. Drug resistance in fungi: An emerging problem. Regional Health Forum. 2011;15:97-103.
- Ellis D. Amphotericin B: Spectrum and resistance. J Antimicrob Chemother. 2002;49:7-10. https://doi.org/10. 1093/jac/49.suppl\_1.7
- Knechtel SA, Klepser ME. Amphotericin B resistance: Epidemiology, mechanisms, and clinical relevance. J Invasive Fungal Infect. 2007;1:93-8.
- 15. Guarro J, Xavier MO, Severo LC. Differences and similarities amongst pathogenic *Aspergillus* species. En: Pasqualotto AC, editor. Aspergillosis: From diagnosis to prevention. Dordrecht: Springer; 2010. p. 7-32.
- Lass-Flörl C, Izquierdo AA, Cuenca-Estrella M, Perkhofer S, Tudela JLR. In vitro activities of various antifungal drugs against Aspergillus terreus: Global assessment using the methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53:794-5. https://doi.org/10.1128/AAC.00335-08
- Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. Aspergillus flavus: An emerging non- fumigatus Aspergillus species of significance. Mycoses. 2009;52:206-22. https://doi.org/10. 1111/j.1439-0507.2008.01642.x
- Seo K, Akiyoshi H, Ohnishi Y. Alteration of cell wall composition leads to amphotericin B resistance in *Aspergillus flavus*. Microbiol Immunol. 1999;43:1017-25. https://doi.org/10. 1111/j.1348-0421.1999.tb01231.x
- Howard SJ, Harrison E, Bowyer P, Varga J, Denning DW. Cryptic species and azole resistance in the Aspergillus niger complex. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:4802-9. https://doi.org/10.1128/AAC.00304-11
- Kaya AD, Kiraz N. In vitro susceptibilities of Aspergillus spp. causing otomycosis to amphotericin B, voriconazole and itraconazole. Mycoses. 2007;50:447-50. https://doi. org/10.1111/j.1439-0507.2007.01409.x
- 21. Gheith S, Saghrouni F, Bannour W, Ben Youssef Y, Khelif A, Normand AC, et al. In vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole and caspofungin of Aspergillus spp. isolated from patients with haematological malignancies in Tunisia. Springerplus. 2014;3:1-8. https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-19
- Almaguer M, Rojas-Flores TI. Aeromicota viable de la atmósfera de La Habana, Cuba. Nova Acta Cient Compostel Biol. 2013;20:35-45.

- Rojas TI, Martínez E, Aira MJ, Almaguer M. Aeromicota de ambientes internos: comparación de métodos de muestreo. Boletín Micológico. 2008;23:67-73.
- Bernal-Martínez L, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M. Diagnostics and susceptibility testing in Aspergillus. Future Microbiol. 2016;11:315-28. https://doi.org/10.2217/fmb.15.140
- Vadlapudi V. Antifungal resistance of few Aspergillus species. Pharmacophore. 2011;2:163-7.
- van der Linden JW, Warris A, Verweij PE. Aspergillus species intrinsically resistant to antifungal agents. Med Mycol. 2011;49:82-9. https://doi.org/10.3109/13693786.2010.499916
- Tokarzewski S, Ziółkowska G, Nowakiewicz A. Susceptibility testing of Aspergillus niger strains isolated from poultry to antifungal drugs a comparative study of the disk diffusion, broth microdilution (M 38-A) and Etest® methods. Pol J Vet Sci. 2012;15:125-33. https://doi.org/10.2478/v10181-011-0123-7
- Pfaller M, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, et al. In vitro survey of triazole cross-resistance among more than 700 clinical isolates of Aspergillus species. J Clin Microbiol. 2008;46:2568-72. https://doi.org/10.1128/ JCM.00535-08
- Pemán J, Salavert M, Cantón E, Jarque I, Romá E, Zaragoza R, et al. Voriconazole in the management of nosocomial invasive fungal infections. Ther Clin Risk Manag. 2006;2:129-58.
- Mayr A, Aigner M, Lass-Flörl C. Caspofungin: When and how? The microbiologist's view. Mycoses. 2011;55:27-35. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02039.x
- Chen SCA, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: A comparison. Drugs. 2011;71:11-41. https://doi.org/10.2165/11585270-000000000-00000
- 32. Lockhart SR, Zimbeck AJ, Baddley JW, Marr KA, Andes DR, Walsh TJ, et al. In vitro echinocandin susceptibility of Aspergillus isolates from patients enrolled in the transplant-associated infection surveillance network. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:3944-6.
- 33. Messer SA, Jones RN, Moet GJ, Kirby JT, Castanheira M. Potency of anidulafungin compared to nine other antifungal agents tested against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Aspergillus* spp.: Results from the global sentry antimicrobial surveillance program (2008). J Clin Microbiol. 2010;48:2984-7. https://doi.org/10.1128/JCM.00328-10
- 34. Badali H, Vaezi A, Haghani I, Yazdanparast SA, Hedayati MT, Mousavi B, et al. Environmental study of azole-resistant Aspergillus fumigatus with TR34 /L98H mutations in the cyp51A gene in Iran. Mycoses. 2013;56:659-63. https://doi.org/10.1111/myc.12089
- 35. Faria-Ramos I, Farinha S, Neves-Maia J, Tavares PR, Miranda IM, Estevinho LM, et al. Development of cross-resistance by Aspergillus fumigatus to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. BMC Microbiol. 2014;14:1-5. https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-155
- 36. Lopetegui CM, Menéndez GMM, Pérez YT, López ME, Castillo EM. Aplicaciones de la aerobiología en el sistema de predicción y vigilancia de la enfermedad moho azul del tabaco en la provincia Pinar del Río, Cuba. Avances. 2006;8:1-11.
- Monteil MA. Saharan dust clouds and human health in the English-speaking Caribbean: What we know and don't know. Environ Geochem Health. 2008;30:339-43.

#### ARTÍCULO ORIGINAL

## Optimización de recursos para determinar la carga viral de HIV-1 en un país con pocos recursos

Amalia Girón-Callejas<sup>1,2</sup>, Ricardo Mendizábal-Burastero<sup>1,2</sup>, Elizabeth Yax<sup>1</sup>, Axel Martínez<sup>1</sup>, Carlos Mejía-Villatoro<sup>1†</sup>

- <sup>1</sup> Clínica de Enfermedades Infecciosas, Hospital Roosevelt, Ciudad de Guatemala, Guatemala
- <sup>2</sup> Universidad del Valle de Guatemala, Ciudad de Guatemala, Guatemala

Introducción. Las metas globales para controlar la epidemia de HIV contemplan que la carga viral sea indetectable en 90 % de las personas en tratamiento. El costo de la medición de la carga viral en lotes de muestras puede reducirse y, así, aumentar la cobertura cuando los recursos son limitados; sin embargo, su eficacia disminuye al aumentar la prevalencia del fracaso del tratamiento antirretroviral. Objetivo. Evaluar estrategias para disminuir la proporción de pacientes con fracaso del tratamiento antirretroviral en los lotes de muestras y, de esta manera, aumentar el ahorro en las pruebas de carga viral. Materiales y métodos. Las estrategias evaluadas fueron: a) la organización de los lotes de muestras según el esquema de tratamiento antirretroviral, y b) la exclusión de aquellos pacientes con antecedente reciente de fracaso del tratamiento antirretroviral, aquellos con menos de 12 meses de tratamiento antirretroviral y aquellos sin tratamiento antirretroviral previo. Los resultados de los lotes se compararon con los resultados individuales.

**Resultados.** El valor diagnóstico negativo fue similar para los pacientes con esquema de primera línea (100,0 %;  $IC_{95\%}$  99,5-100,0) o de segunda línea de tratamiento (99,4 %;  $IC_{95\%}$  96,9-99,9). La incidencia del fracaso del tratamiento antirretroviral fue menor en los pacientes con tratamiento de primera línea (p<0,01), lo cual permitió un mayor ahorro en las pruebas de laboratorio en este grupo (74,0 %;  $IC_{95\%}$  71,0-76,7) que en los pacientes con tratamiento de segunda línea (50,9 %;  $IC_{95\%}$  44,4-57,3) (p<0,01). **Conclusión.** La selección de las muestras que se incluyeron en los lotes para determinar la carga viral del HIV según el tipo de esquema de tratamiento, permitió maximizar el porcentaje de ahorro en pruebas de laboratorio.

**Palabras clave:** HIV; carga viral; ahorro de costo; análisis costo-eficiencia; estrategias. doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3318

#### Optimizing resources to reduce costs to determine HIV viral load in limited resources settings

**Introduction:** HIV viral load testing is a key factor to evaluate the accomplishment of the UNAIDS target of 90% of viral suppression among people receiving antiretroviral therapy. Pooled samples are a potentially accurate and economic approach in resource-constrained settings, but efficiency can be negatively affected by high prevalence rates of virological failure.

**Objective:** Strategies were assessed to increase the relative efficiency of pooled HIV viral load testing in resource-constrained settings.

**Materials and methods:** We evaluated two strategies: a) plasma samples were not included in pools if patients had <12 months on antiretroviral therapy, patients had previous viral load >1,000 copies/ml, or were antiretroviral therapy naïve patients, and b) plasma pools were organized separately for first and second-line antiretroviral therapy regimens. Individual viral load tests were used to compare pooled results.

**Results:** Negative predictive values were similar for patients on first (100.0%; 95% CI 99.5 to 100.0) and second-line antiretroviral therapy regimens (99.4%; 95% CI 96.9 to 99.9). However, the incidence of virological failure among individuals on first-line antiretroviral therapy was lower than second-line antiretroviral therapypatients (p <0.01), resulting in greater savings in laboratory tests in patients on first-line antiretroviral therapy (74.0%; 95% CI 71.0 to 76.7) compared with the group of patients on second-line antiretroviral therapy (50.9%; 95% CI 44.4 to 57.3) (p<0.01).

#### Contribución de los autores:

Carlos Mejía-Villatoro: diseño del estudio

Elizabeth Yax y Axel Martínez: fase experimental y análisis de datos

Amalia Girón-Callejas y Ricardo Mendizábal-Burastero participaron en todas las etapas del estudio.

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

**Conclusion:** Selecting the samples to be included in the pools and selecting the pools according to ART regimens are criteria that could lead to decreased spending on laboratory tests for HIV viral load determination in resource-constrained settings.

Key words: HIV; viral load; cost savings; cost efficiency analysis; strategies.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3318

La medición de la carga viral plasmática del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) es la herramienta empleada para evaluar la efectividad del tratamiento antirretroviral, el cual busca suprimir la replicación del virus (1). Una prueba de laboratorio comúnmente usada para determinar la carga viral es la cuantificación del ARN plasmático del HIV mediante la transcripción inversa del genoma viral y, posteriormente, la reacción en cadena de la polimerasa (reverse transcription Polymerase Chain Reaction, rt-PCR) en tiempo real. Se considera que ha habido fracaso del tratamiento antirretroviral cuando no es efectivo para suprimir la replicación viral, lo cual se establece cuando, en dos ocasiones y con un mes de diferencia como mínimo, la carga viral es mayor de 1.000 copias de ARN por ml de plasma (1).

La carga viral es, entonces, un estándar de la atención en salud que reciben los pacientes infectados con HIV. Es más, las nuevas metas de control de la epidemia de HIV para el año 2020, propuestas por el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el HIV/sida (ONUSIDA), contemplan que la carga viral debe ser indetectable en el 90 % de las personas con tratamiento antirretroviral (2). Sin embargo, en los países en desarrollo, el acceso a esta prueba de laboratorio puede dificultarse debido a su costo (3). Tal es el caso de Guatemala, en donde se ha estimado que los pacientes son sometidos a la prueba de carga viral 1,2 veces al año, en lugar de las dos mediciones recomendadas por el protocolo nacional (4).

La medición de la carga viral de HIV mediante el análisis de las muestras plasmáticas en lotes, se considera una estrategia que reduce los costos relacionados con el control de la efectividad del tratamiento antirretroviral (5,6). Sin embargo, la eficacia de esta estrategia disminuye cuando aumenta la prevalencia de fracaso del tratamiento antirretroviral en la población (7).

Correspondencia:

Ricardo Mendizábal-Burastero, Hospital Roosevelt, Clínica de Enfermedades Infecciosas, zona 11, Ciudad de Guatemala, Guatemala

Teléfono: (502) 2497 7300; fax: (502) 2445 4304 rmendizabalb@gmail.com

Recibido: 25/04/16; aceptado: 07/12/16

El objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad de la estrategia de analizar lotes de muestras organizadas en una matriz para medir la carga viral de HIV después de excluir las muestras de pacientes con antecedente reciente de fracaso del tratamiento antirretroviral, aquellos con menos de 12 meses de estar recibiendo tratamiento antirretroviral y los que no lo habían recibido previamente. Además, se organizaron lotes de muestras según el esquema de tratamiento antirretroviral, asumiendo que, de tener una prevalencia de fracaso del tratamiento antirretroviral diferente según el esquema de tratamiento, la eficiencia de la estrategia se diferenciaría igualmente.

#### Materiales y métodos

Se obtuvo la aprobación del Comité de Ética del Hospital Roosevelt para hacer el estudio en individuos mayores de 18 años en este centro, que atiende a la cohorte más grande de pacientes con HIV bajo tratamiento antirretroviral en Guatemala.

En este estudio no se solicitó el consentimiento informado de los pacientes, ya que las pruebas de carga viral son un servicio que se ofrece regularmente en Guatemala a los pacientes con HIV, y la comparación de las metodologías de laboratorio se hizo con muestras sin identificación personal de los pacientes. A los pacientes se les entregó el resultado de la carga viral determinado por la medición individual de cada muestra de plasma.

#### Selección de las muestras

Se incluyeron solamente aquellos pacientes que habían recibido el tratamiento antirretroviral, por lo menos, durante 12 meses, para contar con, al menos, una carga viral previa, lo cual fue uno de los criterios de inclusión.

Con el propósito de optimizar la eficacia de la estrategia de determinación de la carga viral por lotes de muestras, se excluyó a los pacientes con antecedente reciente de fracaso del tratamiento antirretroviral; estos pacientes se detectaron mediante la revisión de la base de datos de registro de los resultados de carga viral, usando como criterio de exclusión un último resultado de carga viral de ARN mayor de 1.000 copias/ml.

Las muestras se recolectaron de manera consecutiva, con el fin de simular el flujo de trabajo de la clínica. Se seleccionaron 800 muestras de pacientes tratados con el esquema de tratamiento antirretroviral de primera línea (dos inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa y un inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa) y 198 tratados con el esquema de segunda línea (dos inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa y un inhibidor de la proteasa).

Las 998 muestras representaron el 33 % de la cohorte de pacientes en tratamiento en la clínica. El tamaño de la muestra de cada grupo (primera línea y segunda línea) correspondió a la proporción de pacientes que recibía cada tipo de tratamiento.

#### Toma y manejo de las muestras

Se extrajeron 5 ml de sangre venosa en un tubo con anticoagulante con EDTA; la muestra se centrifugó a 20 °C durante 20 minutos a 568g antes de que se cumplieran seis horas de haberla tomado. Se separó el plasma y se almacenó a -20 °C hasta el momento de ser analizado.

#### Organización de las muestras en lotes

Se usó la estrategia de analizar las muestras en lotes, es decir, muestras mezcladas en cantidades iguales y analizadas como una unidad. Los lotes se organizaron, se analizaron y se interpretaron mediante la estrategia de matriz descrita previamente (7), es decir, por columnas y filas, de manera que cada muestra quedó incluida en dos lotes, uno correspondiente a la columna y otro a la fila.

Al encontrar lotes con resultados superiores al punto de corte, se procesaba individualmente la muestra que coincidía con la intersección entre las filas y las columnas para identificar dentro del lote la muestra con alta carga viral (7).

Las muestras se separaron según el esquema de tratamiento antirretroviral que recibía el paciente. Las de aquellos tratados con el esquema de primera línea de antirretrovirales, se organizaron en lotes de diez analizados luego en matrices de diez por diez. En el caso de las muestras de pacientes que recibían el esquema de segunda línea, estas se analizaron en lotes de cinco muestras, organizados en una matriz de cinco por cinco.

La disminución del tamaño del lote de diez a cinco muestras permitió que la estrategia de análisis de la carga viral por lotes se aplicara a una población pequeña de pacientes que recibían el segundo esquema de antirretrovirales, analizando al menos una matriz al mes.

Con el fin de detectar las muestras con una carga viral de ARN mayor de 1.000 copias/ml, parámetro definido como fracaso del tratamiento antirretroviral por el protocolo de país (1), se utilizaron como puntos de corte los resultados de la carga viral de ARN mayor de 100 o 200 copias/ml para los lotes de diez y cinco muestras, respectivamente. El punto de corte se estableció dividiendo el valor por detectar, en este caso 1.000 copias/ml, entre el número de muestras que conformaban el lote, es decir, diez o cinco.

#### Medición de la carga viral de HIV

Se midió la carga viral de HIV por medio de rt-PCR en tiempo real, usando la prueba COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1®, versión 2,0 (Roche, Alameda, California), según las instrucciones del fabricante.

#### Análisis de los datos

El desempeño de la estrategia de análisis de lotes de muestras organizados en una matriz, se comparó con la medición individual de la carga viral de HIV. El valor diagnóstico negativo se estimó usando la función de evaluación de una prueba diagnóstica del programa OpenEpi, versión 3.0.3. La eficacia relativa se estimó como la proporción de ahorro del número de pruebas de laboratorio que debían hacerse. Este mismo programa se usó para estimar la incidencia del fracaso del tratamiento antirretroviral. Con base en el registro de las horas requeridas para determinar la carga viral, se calculó el porcentaje de ahorro en el tiempo empleado, comparando las determinaciones individuales y el análisis por lotes de las muestras.

#### Resultados

De los 998 pacientes cuyas muestras se recolectaron, 55,8 % correspondió al sexo masculino, 42,2 % al femenino y 2,0 % a personas transgénero. La mediana de meses de estar recibiendo el tratamiento fue de 39 (rango intercuartílico: 24-49) y 18 (rango intercuartílico: 16-24) para los pacientes con esquema de primera y segunda línea de tratamiento antirretroviral, respectivamente (cuadro 1). La incidencia de fracaso del tratamiento antirretroviral fue significativamente menor (p<0,01) en los pacientes con prescripción de tratamiento antirretroviral de primera línea que en quienes recibían el esquema de segunda línea (0,9 %;  $IC_{95\%}$  0,4-1,8 y 8,6 %;  $IC_{95\%}$  5,4-13,3, respectivamente).

Con la estrategia de medir la carga viral en lotes de muestras, fue factible detectar a todos los pacientes que presentaban fracaso del tratamiento

Cuadro 1. Características de los pacientes cuyas muestras de plasma se usaron para evaluar el desempeño de la detección de la carga viral de HIV en lotes de muestras

	Pacientes con diferente esquema de tratamiento antirretroviral			
	Primera línea (n=800)	Segunda línea (n=198)		
Sexo				
Masculino	456 (57,0 %)	101 (51,0 %)		
Femenino	328 (41,0 %)	93 (47,0 %)		
Transgénero	16 (2,0 %)	4 (2,0 %)		
Mediana de meses con el esquema de tratamiento antirretroviral	39 (RIC 24-49)	18 (RIC 16- 24)		
Incidencia de fracaso virológico <sup>a</sup>	0,9 % (IC <sub>95%</sub> 0,4-1,8)	8,6 % (IC <sub>95%</sub> 5,4-13,3)		

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Fracaso virológico: resultado de carga viral de HIV mayor de 1.000 copias/ml de plasma RIC: rango intercuartílico 1 y 3; IC: intervalo de confianza

antirretroviral, es decir que tenían una carga viral de ARN individual mayor de 1.000 copias/ml. El valor diagnóstico negativo fue similar usando la estrategia de medir la carga viral en lotes de muestras de pacientes con esquema de primera línea (100,0 %;  $IC_{95\%}$  99,5-100,0) y con esquema de segunda línea (99,4 %;  $IC_{95\%}$  96,9-99,9). Sin embargo, la eficacia relativa, es decir, el porcentaje de ahorro en las pruebas de laboratorio fue mayor en el grupo de pacientes con esquema de primera línea (74,0 %;  $IC_{95\%}$  71,0-76,7) que en el grupo de aquellos con esquema de segunda línea de tratamiento antirretroviral (50,9 %;  $IC_{95\%}$  44,4-57,3) (p<0,01).

Con relación al tiempo empleado para las determinaciones de la carga viral, el ahorro de tiempo al procesar las muestras en lotes, en comparación con las determinaciones individuales, fue similar en las matrices de diez muestras y en las de cinco (cuadro 2).

#### Discusión

El elevado valor diagnóstico negativo que se obtuvo usando la estrategia de determinar la carga viral de HIV en lotes de muestras, garantiza con buen nivel de confianza, que en más del 99 % de los casos de pacientes que no presentan fracaso del tratamiento antirretroviral, la carga viral sea menor de 1.000 copias/ml.

En cuanto al porcentaje de ahorro en las pruebas de laboratorio, el hecho de que la eficacia relativa del esquema de primera línea de tratamiento antirretroviral fue significativamente mayor que el del esquema de segunda línea, se correlacionó inversamente con la diferencia significativa encontrada en la incidencia del fracaso del tratamiento antirretroviral en estos dos grupos. Esto es congruente con el reporte de May, et al., quienes

Cuadro 2. Desempeño de la detección de carga viral de HIV en lotes de muestras de pacientes con diferente esquema de tratamiento antirretroviral

Indicador de desempeño	Pacientes con diferente esquema de terapia antirretroviral				
	Primera línea (n=800)	Segunda línea (n=198)			
Valor diagnóstico negativo Eficacia relativaª	100,0 % (IC <sub>95%</sub> 99,5-100,0) 74,0 % (IC <sub>95%</sub> 71,0-76,7)	99,4 % (IC <sub>95%</sub> 96,9-99,9) 50,9 % (IC <sub>95%</sub> 44,4-57,3)			
Ahorro en tiempo	37,8 % (IC <sub>95%</sub> 21,9-56,8)	38,2 % (IC <sub>95%</sub> 16,6-65,8)			

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Eficacia relativa: porcentaje de ahorro de pruebas de laboratorio IC: intervalo de confianza

realizaron una simulación computacional para evaluar el impacto de la prevalencia del fracaso del tratamiento antirretroviral en la eficacia relativa de la determinación de la carga viral del HIV en muestras organizadas en lotes, y concluyeron que la eficacia de esta estrategia disminuía al aumentar la proporción de individuos con fracaso del tratamiento antirretroviral en la población (7). Es más, los resultados obtenidos experimentalmente en la presente investigación concuerdan con las predicciones de May, et al., tanto para la estrategia de la matriz de 10 x 10 como para la de 5 x 5 muestras, con una incidencia de fracaso del tratamiento antirretroviral de 0,9 y 8,6 %, respectivamente.

Según lo sugerido por van Zyl, et al., en el diseño de esta investigación se hizo la revisión rápida de los registros digitales de los pacientes, con el fin de detectar a aquellos que cumplieran con los criterios para ser incluidos en la estrategia de determinación de la carga viral en lotes de muestras (8). Se incluyeron únicamente las muestras de los pacientes mayores de 18 años y se excluyeron aquellas de quienes no estaban recibiendo

el tratamiento; además, también se excluyeron las muestras de los individuos cuyo resultado de carga viral previo al estudio era mayor de 1.000 copias/ml. De no haberse hecho este proceso de selección, la proporción de pacientes con fracaso del tratamiento antirretroviral hubiera sido mayor y, por ende, la eficacia relativa habría resultado menor, como sucedió en el estudio de Pannus, et al., quienes incluyeron a pacientes con sospecha de fracaso del tratamiento antirretroviral en sus lotes de muestras (16,3 % de las muestras), o en el estudio de Tilghman, et al., en el que se incluyeron muestras de pacientes sobre quienes no había certeza de que estuvieran recibiendo antirretrovirales (18,0 % de las muestras), situación que tuvo un impacto negativo en el porcentaje de ahorro de pruebas de laboratorio, lo cual los llevó a recomendar que los antecedentes de fracaso del tratamiento antirretroviral debían considerarse al diseñar algoritmos para la determinación de la carga viral de HIV por lotes de muestras (6,9).

Este aspecto es muy importante en la implementación y la optimización de esta estrategia, no solo en cuanto a los costos, sino también en cuanto a la operación, ya que esto reduce el número de repeticiones que deben hacerse. Por otra parte, en un contexto de recursos limitados, la disminución de costos en los insumos de laboratorio necesarios para el seguimiento de los pacientes con tratamiento antirretroviral mediante la determinación de la carga viral en lotes de muestras, permitiría ampliar las coberturas y haría factible la sostenibilidad a largo plazo de este servicio.

Además, se la puede considerar como una estrategia complementaria para evaluar el cumplimiento de las metas 90-90-90 que propone ONUSIDA para eliminar la epidemia en el 2030, especialmente, la de alcanzar, en el 2020, cargas virales de ARN menores de 1.000 copias/ml en el 90 % de las personas contratamiento antirretroviral. Es más, en países de recursos limitados y niveles intermedios de resistencia del HIV a los medicamentos antirretrovirales previa al tratamiento, como Guatemala, el dinero ahorrado en las pruebas para determinar la carga viral podría emplearse para introducir rutinariamente la detección de mutaciones puntuales asociadas a la resistencia del HIV antes de que los pacientes inicien su tratamiento antirretroviral (10). La medición de la resistencia previa al tratamiento repercutiría positivamente en la disminución del riesgo de fracaso del tratamiento antirretroviral en los primeros meses de la terapia, disminuiría su

prevalencia y, por ende, ayudaría a cumplir la meta de 90 % de personas en tratamiento antirretroviral con supresión virológica.

En conclusión, la estrategia de determinar la carga viral del HIV en muestras organizadas en lotes es un enfoque preciso y económico para evaluar la eficacia del tratamiento antirretroviral, ya que permite determinar si los pacientes presentan fracaso del tratamiento antirretroviral o no.

Con el fin de optimizar la eficacia de la estrategia, es recomendable seleccionar solamente las muestras de pacientes que hayan estado recibiendo tratamiento antirretroviral durante los 12 meses anteriores, lo que asegura, al menos, dos controles previos de carga viral indetectable y el que no haya antecedente reciente de fracaso del tratamiento antirretroviral. Además, es conveniente hacer diferentes lotes de muestras dependiendo del tipo de esquema de tratamiento antirretroviral, así como de las diferentes prevalencias de fracaso del tratamiento antirretroviral para maximizar el porcentaje de ahorro en pruebas de laboratorio.

#### Agradecimientos

Al equipo administrativo y de laboratorio de la Clínica de Enfermedades Infecciosas del Hospital Roosevelt, en especial, a Claudia Estrada, Jorge Rodas, Nataly García y Carola Melgar, por su invaluable colaboración.

#### Conflicto de intereses

Ninguno.

#### **Financiación**

Este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACYT), otorgado por la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT) de Guatemala (proyecto FODECYT 49-2011).

#### Referencias

- World Health Organization. Consolidated guidelines on general HIV care and the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: Recommendations for a public health approach. London: WHO; 2013.
- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). 90-90-90 An ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic. Geneva: UNAIDS; 2014. Fecha de consulta: 20 de abril de 2016. Disponible en: http://www.unaids.org/ sites/default/files/media\_asset/90-90-90\_en\_0.pdf
- Roberts T, Bygrave H, Fajardo E, Ford N. Challenges and opportunities for the implementation of virological testing in resource-limited settings. J Int AIDS Soc. 2012;15:17324. https://doi.org/10.7448/IAS.15.2.17324

- 4. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Programa Nacional de VIH/Sida, Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud, USAID| Proyecto Capacity Centroamérica. Informe final de la evaluación de la adherencia al tratamiento antirretroviral y condiciones institucionales que puedan influir en el proceso, Guatemala 2015. Guatemala: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social; 2015.
- Smith DM, May SJ, Pérez-Santiago J, Strain MC, Ignacio C, Haubrich RH, et al. The use of pooled viral load testing to identify antiretroviral treatment failure. AIDS. 2009;23:2151-8. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283313ca9
- Pannus P, Fajardo E, Metcalf C, Coulborn RM, Durán LT, Bygrave H, et al. Pooled HIV-1 viral load testing using dried blood spots to reduce the cost of monitoring antiretroviral treatment in a resource-limited setting. J Acquir Immune Defic Syndr. 2013;64:134-7. https://doi.org/10.1097/QAI. 0b013e3182a61e63
- May S, Gamst A, Haubrich RH, Benson CA, Smith D. Pooled nucleic acid testing to identify antiretroviral treatment failure

- during HIV infection. J Acquir Immune Defic Syndr. 2010;53: 194-201. https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181ba37a7
- van Zyl GU, Preiser W, Potschka S, Lundershausen AT, Haubrich R, Smith D. Pooling strategies to reduce the cost of HIV-1 RNA load monitoring in a resource-limited setting. Clin Infect Dis. 2011;52:264-70. https://doi.org/10.1093/cid/ cig084
- Tilghman MW, Guerena DD, Licea A, Pérez-Santiago J, Richman DD, May S, et al. Pooled nucleic acid testing to detect antiretroviral treatment failure in México. J Acquir Immune Defic Syndr. 2011;56:e70-4. https://doi.org/10.1097/ QAI.0b013e3181ff63d7
- Ávila-Ríos S, García-Morales C, Garrido-Rodríguez D, Tapia-Trejo D, Girón-Callejas AC, Mendizábal-Burastero R, et al. HIV-1 drug resistance surveillance in antiretroviral treatment-naive individuals from a reference hospital in Guatemala, 2010-2013. AIDS Res Hum Retroviruses. 2015; 31:401-11. https://doi.org/10.1089/aid.2014.0057

#### ARTÍCULO ORIGINAL

# Características de la infección por *Clostridium difficile* en una institución de alta complejidad y reporte de la circulación en Colombia de la cepa hipervirulenta NAP1/027

Sandra Milena Gualtero, Lina Alejandra Abril, Nathalia Camelo, Susi Daniela Sánchez, Gerson Arias, Edwin Silva, Fabián Antonio Dávila, Ingrid Gissel Bustos, Diego Fernando Josa, Isabel Cristina Torres, Luis Carlos Zambrano, María José Pareja

Grupo de Infectología y Laboratorio, Fundación Clínica Shaio, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** Clostridium difficile es el principal responsable de la diarrea asociada al uso de antibióticos. En Colombia y en Latinoamérica, el conocimiento sobre el comportamiento epidemiológico de la infección por *C. difficile* todavía es limitado.

Objetivo. Describir las características de una serie de pacientes con infección por C. difficile.

**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio descriptivo de una serie de casos de pacientes con infección por *C. difficile* atendidos en la Fundación Clínica Shaio, entre enero de 2012 y noviembre de 2015.

**Resultados.** Se estudiaron 36 pacientes con una edad promedio de 65 años. Se determinaron los siguientes factores relacionados con la infección por *C. difficile*: uso previo de antimicrobianos (94,4%), hospitalización en los últimos tres meses (66,7%) y uso de inhibidores de la bomba de protones (50%). Las comorbilidades más comunes fueron la enfermedad renal crónica (41,7%) y la diabetes mellitus (30,6%). Los síntomas más frecuentes fueron más de tres deposiciones diarreicas (97,1%) y dolor abdominal (42,9%). En cuanto a la gravedad de los casos, 44,4% se clasificó como leve a moderado, 38,9% como grave, y 11,1% como complicado o grave. El método de diagnóstico más utilizado (63,8% de los pacientes) fue la identificación de la toxina mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La mortalidad global durante la hospitalización fue de 8%. Se identificaron cuatro cepas del serotipo NAP1/027 y nueve muestras fueron positivas para la toxina binaria.

**Conclusión.** La infección por *C. difficile* debe sospecharse en pacientes con deposiciones diarreicas y factores asociados tradicionalmente a esta enfermedad. Se reportó la circulación de cepas hipervirulentas del serotipo NAP1/027 en Colombia, lo cual debe enfrentarse con la vigilancia epidemiológica y el diagnóstico temprano.

Palabras clave: Clostridium difficile; infecciones bacterianas; antiinfecciosos; diarrea; enterocolitis seudomembranosa; reacción en cadena de la polimerasa.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3244

### Characteristics of *Clostridium difficile* infection in a high complexity hospital and report of the circulation of the NAP1/027 hypervirulent strain in Colombia

**Introduction:** Clostridium difficile is the main pathogen related to healthcare-associated diarrhea and it is the cause of 20 to 30% of diarrhea cases caused by antibiotics. In Colombia and Latin America, the knowledge about the epidemiological behavior of this infection is limited.

**Objective:** To describe the characteristics of a series of patients with *C. difficile* infection.

**Materials and methods:** We performed a descriptive case series study of patients with *C. difficile* infection hospitalized in the *Fundación Clínica Shaio* from January, 2012, to November, 2015.

**Results:** We analyzed 36 patients. The average age was 65 years. The risk factors associated with the infection were: previous use of antibiotics (94.4%), prior hospitalization in the last three months (66.7%) and use of proton pump inhibitors (50%). The most common comorbidities were chronic kidney disease (41.7%) and diabetes mellitus (30.6%). The most frequent symptoms were more than three loose stools per day (97.1%) and abdominal pain (42.9%). According to the severity of the disease, 44.4%

#### Contribución de los autores:

Sandra Milena Gualtero, Nathalia Camelo, Susi Daniela Sánchez: diseño del estudio y la base de datos, revisión de la literatura y redacción del artículo

Lina Alejandra Abril: introducción a la base de datos de las variables de los pacientes del año 2015 y redacción del artículo Fabián Antonio Dávila y María José Pareja: análisis estadístico

Gerson Arias y Edwin Silva: revisión de la literatura y redacción del artículo

Ingrid Gisell Bustos, Diego Fernando Josa, Isabel Cristina Torres, Luis Carlos Zambrano: recolección de los datos para la selección de los pacientes incluidos en el estudio

of cases were classified as mild to moderate, 38.9% as severe, and 11.1% as complicated or severe. The detection of the toxin by PCR (GeneXpert) was the most common diagnostic procedure (63.8%). Global mortality during hospitalization was 8%. We identified four strains with serotype NAP1/027 and nine samples positive for binary toxin.

**Conclusion:** Clostridium difficile infection should be suspected in patients with diarrhea and traditional risk factors associated with this disease. We report the circulation of the hypervirulent strain serotype NAP1/027 in Colombia, which should be countered with epidemiological surveillance and a prompt diagnosis.

**Key words:** Clostridium difficile; bacterial infections; anti-infective agents; diarrhea; enterocolitis, pseudomembranous; polymerase chain reaction.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3244

Clostridium difficile es el principal agente patógeno responsable de la diarrea asociada al cuidado de la salud, y representa entre 20 y 30 % de los casos de diarrea asociada con el uso de antibióticos. En 2010, se reportó en Estados Unidos una incidencia de 8,2 casos por cada 1.000 pacientes hospitalizados y una mortalidad de 6 a 30 %, con costos anuales para el sistema de salud que excedieron los USD \$1.500 millones.

Desde el 2001, la incidencia de casos de infección por *C. difficile* en Estados Unidos se ha incrementado en 400 %, incremento favorecido por la aparición de cepas hipervirulentas como la NAP1/O27 (*North American PFGE type1/ribotype O27*), la cual produce de 16 a 23 veces más toxina A y toxina B que los aislamientos previos de *C. difficile*. Otros factores que han contribuido han sido el aumento progresivo de la edad de los pacientes hospitalizados y de sus comorbilidades, la disponibilidad de mejores métodos diagnósticos y, en algunas ocasiones, el uso indiscriminado de los tratamientos antibióticos, los cuales han contribuido al comportamiento epidémico de este microorganismo (1-6).

El cuadro clínico de la infección por *C. difficile* es diverso e incluye, desde los portadores asintomáticos o con diarrea leve, hasta la presentación de colitis seudomembranosa, megacolon tóxico, sepsis y muerte. La patogenia de la enfermedad responde a múltiples factores y condiciones tales como la adquisición del patógeno, la disrupción de la microbiota intestinal, la producción de toxinas por el microorganismo y una inadecuada reacción inmunitaria del huésped.

Correspondencia:

Sandra Milena Gualtero, Diagonal 115A N° 70C-75, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: (571) 593 8210 sandra.gualtero@gmail.com

Recibido: 21/02/16; aceptado: 07/12/16

Cuando el microrganismo coloniza el intestino, se produce un daño directo en los enterocitos causado por las toxinas bacterianas A v B, v por la toxina binaria. La toxina A es una enterotoxina que rompe las uniones intercelulares de los enterocitos y facilita el ingreso de la toxina B, la cual activa los macrófagos y los mastocitos que, a su vez, generan un aumento de la permeabilidad epitelial, de la producción de citocinas, la infiltración de neutrófilos, la producción de intermediarios de especies reactivas del oxígeno, la activación de mastocitos, la producción de sustancia P y el daño directo en la mucosa. En cuanto a la toxina binaria, su mecanismo patogénico aún no está del todo dilucidado, pero al parecer incrementa la adhesión de las cepas de C. difficile y actúa a nivel del citoesqueleto de la célula, provocando una mayor pérdida de líquidos, por lo que las cepas portadoras de dicha toxina se han asociado a una mayor virulencia (4,5,7-9).

En Colombia y en Latinoamérica, el conocimiento sobre el comportamiento epidemiológico de la infección por *C. difficile* se reduce a unas pocas publicaciones que no permiten establecer el impacto real y las características clínicas y epidemiológicas de la enfermedad (10-12), por lo que, muchas veces, se ha hecho necesario extrapolar datos publicados de otras regiones del mundo a la población colombiana.

El objetivo de este estudio fue describir las características clínicas y epidemiológicas de una serie de casos de infección por *C. difficile* atendidos en la Fundación Clínica Shaio, determinar los factores relacionados con la enfermedad, y determinar la presencia de la cepa hipervirulenta NAP1/O27 en la población de estudio.

#### Materiales y métodos

#### Diseño del estudio

Se hizo un estudio descriptivo de una serie de casos de pacientes con infección por *C. difficile* atendidos en la Fundación Clínica Shaio, desde el 1º de enero de 2012 hasta el 30 de noviembre de 2015.

La información se recolectó en la base de datos del laboratorio clínico mediante la búsqueda y la revisión de las solicitudes de pruebas diagnósticas de infección por *C. difficile* (toxina A y B mediante ELISA, toxina B y binaria mediante PCR e identificación de la cepa NA1/027 mediante la prueba GeneXpert *C. difficile*), y la revisión de los códigos relacionados de la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10) en el registro de historias clínicas de la institución durante el periodo de estudio.

Se definió como caso de infección asociada al cuidado de la salud, el de aquellos pacientes con antecedente de hospitalización de, al menos, dos días en los tres meses previos, una estancia mayor de 48 horas, pacientes en hemodiálisis, quimioterapia, tratamiento antibiótico intravenoso en casa, y pacientes atendidos en la clínica por heridas en casa, o internos en un hogar geriátrico o en una institución para el cuidado de condiciones crónicas.

La gravedad del cuadro clínico de infección por *C. difficile* se clasificó según la guía de práctica clínica para la infección por *Clostridium difficile* en adultos, de la *Society for Healthcare Epidemiology of America* (SHEA) y la *Infectious Disease Society of America* (IDSA) en su actualización de 2010, así: leve a moderado, grave y grave o complicado (13).

#### Criterios de inclusión

Se incluyeron todos los pacientes con más de tres deposiciones líquidas al día en ausencia de laxantes, mayores de 18 años, y con diagnóstico confirmado de infección por *C. difficile* por toxina A o B mediante ELISA, o por toxina B o toxina binaria mediante PCR GeneXpert *Clostridium difficile*, por colonoscopia o biopsia. Se determinó la frecuencia de las estancias hospitalarias previas y prolongadas, el uso previo de antibióticos, la cirugía abdominal reciente y el estado de inmunosupresión, así como la gravedad de las manifestaciones clínicas, la frecuencia de ingreso a la unidad de cuidados intensivos y el tratamiento.

Dado que se trató de un estudio retrospectivo basado en la revisión de historias clínicas, no hubo necesidad de consentimiento informado por parte de los pacientes.

#### Análisis estadístico

Se hizo un análisis estadístico descriptivo de las variables de interés. Se obtuvieron las prevalencias de cada variable para la muestra total. Los resultados se expresaron como porcentajes y, como medida de tendencia central, se calcularon las medianas.

ya que las variables no siguieron una distribución normal. Los datos se ingresaron en una base de datos en el programa Excel y se utilizó el programa estadístico SPSS®, versión 23, para el análisis.

#### Resultados

Durante el periodo de estudio de cuatro años y diez meses, se detectaron 261 pacientes con sospecha de infección por *C. difficile*, de los cuales se confirmaron 36 (13,8 %). De ellos, el 52,8 % correspondía a mujeres; la mediana de edad del promedio de los pacientes fue de 65 años (rango intercuartílico, RIQ=57,75-76,75); la mediana del índice de masa corporal (IMC) fue de 23,2 kg/m² (RIQ=19,76-25,86 kg/m²).

En el momento del diagnóstico, la mediana de leucocitos fue de 11.100 células/µl (RIQ=8.800-16.700), la de la proteína C reactiva, de 55,08 mg/L (RIQ=13,66-129,7),y la de la creatinina, de 1,0 mg/dl (RIQ=0,7-1,9 mg/dl).

En cuanto a las características clínicas, los síntomas más frecuentes fueron la presencia de más de tres deposiciones diarreicas (34 pacientes; 97,1 %) y de dolor abdominal (15 pacientes; 42,9 %). El 91,6 % (33) de los casos cumplían con los criterios de infección asociada al cuidado de la salud (cuadro 1).

Al explorar en la serie de casos la presencia de factores de riesgo reconocidos para la infección por *C. difficile*, se encontró que el uso previo de antibióticos (94,4 % de los casos), la hospitalización en los tres meses previos (66,7 %) y el uso de inhibidores de la bomba de protones (50 %) fueron las condiciones de riesgo más frecuentes (cuadro 2).

En cuanto al tipo de antimicrobiano empleado, 23 (63,9 %) pacientes habían recibido previamente betalactámicos, siete (19,4 %), metronidazol, y seis (16,7 %), trimetoprim/sulfametoxazol (cuadro 3).

En trece (36,1 %) casos, el diagnóstico se había hecho con base en la detección de toxinas mediante ELISA, y, en 23 casos (63,9 %), mediante PCR GeneXpert *Clostridium difficile*. Con el uso de la técnica de GeneXpert, se detectó la toxina B en el 100 % de las muestras, de la toxina binaria en 9 (39,1 %) de ellas y de la cepa hipervirulenta NAP1/027 en cuatro (17,3 %) muestras (cuadro 4).

La gravedad se clasificó como leve a moderada en 16 (44,4 %) casos, como grave en 14 (38,9 %), y como grave o complicada en cuatro (11,1 %); en dos (5,6 %) casos no se determinó la gravedad.

Cuadro 1. Características generales de los pacientes en el momento del diagnóstico

Variable	n (%)
Sexo	
Masculino	17 (47,2)
Femenino	19 (52,8)
Mediana de edad (años)	65 (RIQ=57,75-76,75)
Mediana de peso (kg)	62 (RIQ=50-74)
Mediana de la talla (m)	1,61 (RIQ=1,58-1,66)
Mediana del índice de masa corporal Recuento de leucocitos Niveles de proteína C reactiva (mg/L) Niveles de creatinina (mg/dl)	23,18 (RIQ=19,7-25,8) 11.100 (RIQ=88,00-167,00) 55,08 (RIQ=13,66-129,70) 1,0 (RIQ=0,7-1,9)
Más de tres deposiciones diarreicas Malestar general Dolor abdominal Náuseas Anorexia Variables asociadas al cuidado de la salud	34 (94,4) 8 (22,2) 15 (41,6) 5 (13,8) 2 (5,5) 33 (91,6)

RIQ: rango intercuartílico

Cuadro 2. Antecedentes de los pacientes

Variable	n (%)
Uso previo de antibióticos	34 (94,4)
Hospitalización en los tres meses previos	24 (66,7)
Uso de inhibidores de la bomba de protones	18 (50,0)
Enfermedad renal crónica	15 (41,7)
Tratamiento inmunosupresor	10 (31,3)
Diabetes mellitus	11 (30,6)
Insuficiencia cardiac congestiva	8 (22,2)
Diálisis	7 (19,4)
Cirugía abdominal	7 (19,4)
Quimioterapia	3 (8,3)
Enfermedad inflamatoria intestinal	2 (5,6)
Nutrición	
Vía oral	35 (97,2)
Sonda nasogástrica	1 (2,8)

Cuadro 3. Antibióticos administrados previamente

Variable	n (%)
Betalactámicos	23 (63,8)
Metronidazol	7 (19,4)
Trimetoprim-sulfametoxazol	6 (16,7)
Fluoroquinolonas	4 (11,1)
Vancomicina	4 (11,1)
Fosfomicina	1 (2,8)
Nitrofurantoína	1 (2,8)

Tres (8,8 %) pacientes fallecieron antes del egreso hospitalario y el tiempo promedio transcurrido desde el ingreso hospitalario hasta el momento del diagnóstico fue de ocho días (RIQ=1,25-24,5 días).

La mediana de estancia de los diez pacientes atendidos en la unidad de cuidados intensivos fue de 3,5 días (RIQ=2-6,5 días) (cuadro 5).

#### Discusión

Durante la última década, son pocos los estudios que se han hecho para determinar la prevalencia de infección por C. difficile en nuestro medio y, hasta la fecha, no se había reportado la circulación de cepas hipervirulentas en Colombia. En el 2009, Otero, et al., publicaron un estudio observacional en 2.244 pacientes adultos mayores sometidos a colonoscopia, en 15 % de los cuales se había detectado colitis, y en 20 % de ellos de probable origen infeccioso (en 40 % de estos casos se identificó C. difficile) (11). En el 2011, Becerra, et al., publicaron un estudio de 22 casos y 44 controles en el Hospital Universitario San Vicente Fundación y determinaron los siguientes factores de riesgo: edad mayor de 65 años (OR=3,4), estancia en la unidad de cuidados intensivos (OR=4,0) y uso de inhibidores de la bomba de protones (OR=5,1) (12).

En el presente estudio, el 13,8 % de las muestras de pacientes con sospecha de infección por C. difficile fue positivo. Los datos estimados del porcentaje de positividad de las pruebas contrasta acentuadamente con lo informado en otros países de Latinoamérica, como en Costa Rica, donde se reportó una cercana a 30 % (14). En un hospital general de Argentina, se evidenció que 32 de 87 (36,8 %) pacientes con sospecha de infección por C. difficile resultaron positivos para las toxinas de C. difficile detectadas mediante ensavo inmunoenzimático o cultivo toxígeno (15). En Río de Janeiro, se reportó un brote de diarrea por C. difficile en una unidad de cuidados intensivos en donde se detectó su presencia en 43 de 218 (19,7 %) pacientes (16). En el 2001, se publicó un estudio realizado en el Departamento de Gastroenterología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, en el cual 26 de 92 (28 %) pacientes tuvieron cultivo toxígeno positivo para *C. difficile* (17).

El primer reporte de la cepa NAP1/027 en Latinoamérica provino de Costa Rica, donde esta se detectó en 54 % de los casos clínicos de diarrea en un hospital (18). En la serie de casos del presente estudio, se logró detectar la cepa NAP1/027 en 4 (11,1 %) de los 36 casos y la toxina binaria en 9 (25 %), lo cual evidencia la circulación de cepas hipervirulentas en nuestro territorio. Debido a la escasez de casos con la cepa NAP1/027, no se pudieron establecer diferencias con respecto a los causados por cepas que no son hipervirulentas, pero el hallazgo de los cuatro casos constituye una

Cuadro 4. Diagnóstico

Variable		n (%)	
Método diagnóstico	PCR (GeneXpert) PCR más colonoscopia ELISA ELISA más colonoscopia	21 (58,3) 2 (5,6) 11 (30,6) 2 (5,6)	Toxina B: 23 (100) Toxina binaria: 9 (39,1) / Cepa NAP1/027: 4 (17,3)

Cuadro 5. Clasificación según la gravedad y el tratamiento

Variable	n (%)		
Gravedad			
Leve a moderada	16 (44,4)		
Grave	14 (38,9)		
Grave o complicada	4 (11,1)		
No determinada	2 (5,6)		
Tratamiento antimicrobiano			
Metronidazol	23 (67,6)		
Vancomicina	8 (23,5)		
Metronidazol más vancomicina	3 (8,8)		
Tiempo hasta el diagnóstico (días)	8 (RIQ=1,25-24,5)		
Tiempo de estancia en la unidad de cuidados intensivos (días)	3,5 (RIQ=2-6,5)		
Muerte durante la hospitalización			
No	31 (86,1)		
Sí	3 (8,8)		

alerta epidemiológica para Colombia, ya que la cepa está asociada a una alta tasa de mortalidad y tiene una gran capacidad para diseminarse con rapidez, como se ha reportado a nivel mundial (19).

En 44,4 % de los pacientes incluidos en el presente estudio, se presentó infección leve a moderada, en 38,9 %, grave, y tan solo en 11,1 % hubo infección grave o complicada, lo cual contrasta con lo encontrado en otros estudios en los que los casos de infección grave o complicada han sido más frecuentes cuando se ha constatado la circulación de cepas hipervirulentas (4,5).

En esta serie de casos, se detectaron factores relacionados con la infección por *C. difficile* como la edad avanzada, el uso de antibióticos, la hospitalización previa, el uso de inhibidores de la bomba de protones y la comorbilidad, lo cual concuerda con lo reportado ampliamente en otros estudios (12, 20-23). En 2001, Fernández-Caniggia, *et al.*, (24) reportaron la edad avanzada, las comorbilidades, la hospitalización, el tratamiento antimicrobiano y la inmunosupresión reciente, como factores asociados a la infección por *C. difficile* en una serie de 245 pacientes en Argentina (25). En México, en un estudio de 113 casos y 226 controles, Camacho-Ortiz, *et al.*, encontraron que la edad de más de 65 años, el uso de inhibidores de la bomba de protones,

la hospitalización durante las 12 semanas previas al diagnóstico, la hospitalización prolongada, la estancia en la unidad de cuidados intensivos y el uso previo de antibióticos, eran factores de riesgo para la infección por *C. difficile* (26).

En la presente serie, el factor más frecuentemente relacionado con la infección por *C. difficile* fue el uso previo de antibióticos, lo cual no sorprende, pues es el factor más mencionado en los estudios. No hubo pacientes que hubieran usado previamente clindamicina, pero sí se encontró uso muy frecuente de betalactámicos antes del diagnóstico de infección por *C. difficile*, lo cual también coincide con lo reportado en otros estudios en Latinoamérica (27).

La técnica de PCR en tiempo real (sistema GeneXpert) fue el método diagnóstico de elección en 63,8 % de los casos. Esta técnica comenzó a emplearse en la institución en 2014 y reemplazó la identificación de toxinas mediante ELISA.

La técnica de referencia para la detección de cepas de *C. difficile* toxígenas es el cultivo de heces, cuya sensibilidad es de 94 a 100 % y su especificidad es de 99% (28,29). Este método requiere de un laboratorio de referencia que haya estandarizado la técnica.

Las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos, incluida la PCR en tiempo real, tienen una sensibilidad de 87 a 94 % y una especificidad de 94 a 97 % para la detección de cepas toxígenas, y una sensibilidad y una especificidad mayores de 95 % para la detección de la cepa NAP1/027 (30,31), en tanto que la ELISA tiene una sensibilidad de 73 a 87 % y una especificidad de 97 a 98 % para la detección de las toxinas A y B (29,32).

Esta menor sensibilidad de la técnica ELISA, así como la incorporación de las técnicas de PCR en tiempo real en el laboratorio clínico (cuyos resultados se obtienen en tres horas), y la capacidad de la prueba GeneXpert para detectar cepas hipervirulentas como la NAP01/027, la han convertido en la técnica de elección en los últimos tres años en nuestra institución.

Su utilización incrementó la detección de la infección por *C. difficile*, con lo cual se pudo optimizar el tratamiento y adoptar las medidas de aislamiento oportunas en el caso de muchos pacientes. Sin embargo, en algunos estudios se ha reportado que puede haber pacientes asintomáticos, cuya infección no se detecta con el uso exclusivo de técnicas basadas en la PCR, por lo cual algunas guías recomiendan el uso de algoritmos de múltiples pasos que incluyen más de un método diagnóstico: PCR y ELISA o el empleo de la glutamato deshidrogenasa (32,33).

En la presente serie, dos de los pacientes presentaron menos de tres deposiciones diarreicas y en ellos se detectó la toxina mediante PCR; se les tuvo en cuenta para el análisis, ya que se hizo el diagnóstico de infección por *C. difficile*, y se les suministró el tratamiento específico. De todas maneras, debe advertirse sobre el riesgo de falsos positivos con la técnica, especialmente en aquellos casos que no cumplen estrictamente con los criterios clínicos. Cuando no es posible combinar diversas pruebas, en nuestra institución se utiliza la prueba GeneXpert únicamente en pacientes con un cuadro clínico compatible con las definiciones ya mencionadas y claros factores de riesgo para la infección por *C. difficile*.

Este reporte presenta algunas limitaciones. Al tratarse de una serie de casos y no de un estudio de corte transversal, no se hizo el cálculo de las tasas de ataque e incidencia de la infección. Tampoco, pudieron establecerse criterios diagnósticos de referencia para evaluar si se había sobrestimado la presencia de infección por C. difficile al utilizar la técnica de PCR. Asimismo, dado que no se trató de un estudio analítico, no se pudo evaluar la presencia de factores de riesgo y solo se enumeraron algunos factores clínicos relevantes debido a su frecuencia de aparición en la serie, los cuales se han asociado con el riesgo de infección por C. difficile en diversos estudios. No obstante, con base en los resultados es posible concluir que la infección estaba presente en la población de estudio y que las características sociodemográficas y las variables clínicas de la serie eran similares a las reportadas en la literatura sobre el tema.

En el presente estudio, se estableció la circulación de cepas hipervirulentas en el país, lo cual evidencia la necesidad de establecer un sistema de vigilancia para la detección temprana y la adopción de medidas de control, con el fin de evitar la expansión de este patógeno. Por último, debe aclararse que el diagnóstico de los casos de infección por *C. difficile* correspondientes al primer año considerado en el estudio, se basaba principalmente en la determinación de toxinas mediante ensayo inmunoenzimático, el cual se sustituyó posteriormente por la prueba GeneXpert.

En el futuro, será necesario hacer estudios de corte transversal para evaluar la incidencia y la tasa de ataque de infección por *C. difficile* en esta población, así como implementar sistemas de vigilancia que analicen su comportamiento en el tiempo. Asimismo, se requieren estudios analíticos para evaluar con precisión los factores de riesgo de la infección por la cepa NAP1/027 de *C. difficile* en nuestro medio, con el fin de planear estrategias que contengan o desaceleren su eventual expansión.

#### **Agradecimientos**

A la Unidad de Cuidados intensivos y al Departamento Médico de la Fundación Clínica Shaio, responsables de la atención de los pacientes.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

#### **Financiación**

El estudio no requirió de financiación. Se llevó a cabo en las instalaciones de la Fundación Clínica Shaio.

#### Referencias

- Elixhauser A, Jhung M. Clostridium difficile-associated disease in U.S. hospitals, 1993-2005. Statistical Brief #50. Rockville: Agency for Health Care Policy and Research; 2008
- Reveles KR, Lee GC, Boyd NK, Frei CR. The rise in Clostridium difficile infection incidence among hospitalized adults in the United States: 2001-2010. Am J Infect Control. 2014;42:1028-32. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.06.011
- Zimlichman E, Henderson D, Tamir O, Franz C, Song P, Yamin CK, et al. Healthcare-associated infections: A metaanalysis of costs and financial impact on the US healthcare system. JAMA Intern Med. 2013;173:2039-46. https://doi. org/10.1001/jamainternmed.2013.9763
- Leffler DA, Lamont JT. Clostridium difficile infection. N Engl J Med. 2015;372:1539-48. https://doi.org/10.1056/ NEJMc1506004
- McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC Jr, Kazakova SV, Sambol SP, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. N Engl J Med. 2005;353:2433-41. https://doi.org/10.1056/NEJMoa051590
- Rodríguez-Pardo D, Mirelis B, Navarro F. Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013;31:254-63. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012. 12.010

- Hurley BW, Nguyen CC. The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. Arch Intern Med. 2002;162:2177-84. https://doi.org/10.1001/archinte.162.19.2177
- 8. **Pothoulakis C.** Effects of *Clostridium difficile* toxins on epithelial cell barrier. Ann N Y Acad Sci. 2000;915:347-56. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05263.x
- Hopkins MJ, Macfarlane GT. Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with Clostridium difficile infection. J Med Microbiol. 2002;51:448-54. https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-5-448
- Blanco A, Ruiz O, Otero W, Gómez M. Infección por Clostridium difficile en ancianos. Rev Col Gastroenterol. 2013;28:53-63.
- Otero W, González A, Gómez M. Prevalencia de diferentes tipos de colitis en personas adultas mayores. Rev Col Gastroenterol. 2009;24:272-8.
- Becerra MG, Ospina S, Atehortúa SL, Berbesi DY. Factores de riesgo para la infección por Clostridium difficile. Infectio. 2011;15:220-6. https://doi.org/10.1016/S0123-9392 (11)70735-4
- 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. https://doi.org/10.1086/651706
- Zumbado-Salas R, Gamboa-Coronado MM, Rodríguez-Cavallini E, Chaves-Olarte E. Clostridium difficile in adult patients with nosocomial diarrhea in a Costa Rican hospital. Am J Trop Med Hyg. 2008;79:164-5.
- Legaria MC, Lumelsky G, Rosetti S. Clostridium difficileassociated diarrhea from a general hospital in Argentina. Anaerob. 2003;9:113-6. https://doi.org/10.1016/S1075-9964 (03)00088-X
- 16. Balassiano IT, Dos Santos-Filho J, de Oliveira MP, Ramos MC, Japiassu AM, Dos Reis AM, et al. An outbreak case of Clostridium difficile-associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;68:449-55. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.017
- 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.
- Quesada-Gómez C, Rodríguez C, Gamboa-Coronado M del M, Rodríguez-Cavallini E, Du T, Mulvey MR, et al. Emergence of Clostridium difficile NAP1 in Latin America. J Clin Microbiol. 2010;48:669-70. https://doi.org/10.1128/ JCM.02196-09
- Khanna S, Gupta A, Baddour LM, Pardi DS. Epidemiology, outcomes, and predictors of mortality in hospitalized adults with *Clostridium difficile* infection. Intern Emerg Med. 2016;11:657-65. https://doi.org/10.1007/s11739-015-1366-6
- Shin JH, High KP, Warren CA. Older is not wiser, immunologically speaking: Effect of aging on host response to Clostridium difficile infections. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2016;71:916-22. https://doi.org/10.1093/gerona/glv229

- Dial S, Alrasadi K, Manoukian C, Huang A, Menzies D. Risk of Clostridium difficile diarrhea among hospital inpatients prescribed proton pump inhibitors: Cohort and case-control studies. CMAJ. 2004;171:33-8. https://doi.org/10.1503/cmaj.1040876
- 22. Thongprayoon C, Cheungpasitporn W, Phatharacharukul P, Edmonds PJ, Kaewpoowat Q, Mahaparn P, et al. Chronic kidney disease and end-stage renal disease are risk factors for poor outcomes of Clostridium difficile infection: A systematic review and meta-analysis. Int J Clin Pract. 2015;69:998-1006. https://doi.org/10.1111/ijcp.12672
- Anand A, Glatt AE. Clostridium difficile infection associated with antineoplastic chemotherapy: A review. Clin Infect Dis. 1993;17:109-13.
- 24. 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.
- 25. Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, Mendelsohn AB, Nouri K, Posey K, et al. A large outbreak of Clostridium difficile—associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. Infect Control Hosp Epidemiol. 2005; 26:273-80.
- 26. Camacho-Ortiz A, Galindo-Fraga A, Rancel-Cordero A, Macías AE, Lamothe-Molina P, Ponce de León-Garduño A, et al. Factors associated with Clostridium difficile disease in a tertiary-care medical institution in Mexico: A case-control study. Rev Invest Clin. 2009;61:371-7.
- Balassiano IT, Yates A, Domingues CP, Ferreira EO. Clostridium difficile: A problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. J Med Microbiol. 2012;61:169-79. https://doi.org/10.1099/jmm.0.037077-0.
- Delmée M. Laboratory diagnosis of Clostridium difficile disease. Clin Microbiol Infect. 2001;7:411-6. https://doi. org/10.1046/j.1198-743x.2001.00294.x
- Crobach MJT, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). Clin Microbiol Infect. 2009;15:1053-66. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691. 2009.03098.x
- Deshpande A, Pasupuleti V, Rolston DDK, Jain A, Deshpande N, Pant C, et al. Diagnostic accuracy of realtime polymerase chain reaction in detection of Clostridium difficile in the stool samples of patients with suspected Clostridium difficile infection. Clin Infect Dis. 2011;53:e81-90. https://doi.org/10.1093/cid/cir505
- O'Horo JC, Jones A, Sternke M, Harper C, Safdar N. Molecular techniques for diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Mayo Clin Proc. 2012;87:643-51. https://doi.org/10. 1016/j.mayocp.2012.02.024
- Planche T, Aghaizu A, Holliman R, Riley P, Poloniecki J, Breathnach A, et al. Diagnosis of Clostridium difficile infection by toxin detection kits. Lancet Infect Dis. 2008;8: 777-84. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70233-0
- Bagdasarian N, Rao K, Malani PN. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults: A systematic review. JAMA. 2015;313:398-408. https://doi.org/10.1001/ jama.2014.17103

#### ARTÍCULO ORIGINAL

# Resultados de la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud, Colombia, 2012-2014

María Victoria Ovalle<sup>1</sup>, Sandra Yamile Saavedra<sup>2</sup>, María Nilse González<sup>2</sup>, Andrea Melissa Hidalgo<sup>2</sup>, Carolina Duarte<sup>2</sup>, Mauricio Beltrán<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
- <sup>2</sup> Programa de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud, Grupo de Microbiología, Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** En el tercer trimestre de 2012, comenzó a operar el Sistema Nacional de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana en las infecciones asociadas a la atención en salud, con el fin de recabar y analizar la información referente al problema en Colombia.

**Objetivo.** Describir los perfiles de resistencia y los resultados de la vigilancia por el laboratorio con base en los datos recolectados en el Sistema.

**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio descriptivo y retrospectivo con base en la información del Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública, Sivigila, 1 de septiembre de 2012 a 31 de diciembre de 2014, así como de las bases de datos Whonet con los datos notificados por las unidades primarias generadoras de datos y los resultados de la confirmación por el laboratorio de la caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a carbapenemasas en 1.642 aislamientos (927 de enterobacterias, 614 de *Pseudomonas* spp. y 101 de *Acinetobacter* spp.).

**Resultados.** La resistencia de *Escherichia coli* a las cefalosporinas de tercera generación presentó un incremento significativo, alcanzando 26,3 % en unidades de cuidados intensivos y 22,5 % en otras áreas de hospitalización. La resistencia a ertapenem de *Klebsiella pneumoniae* registró un incremento y alcanzó 14,6 % en unidades de cuidados intensivos. La resistencia de *Acinetobacter baumannii* a los carbapenémicos superó el 50 % en dichas unidades, en tanto que en *Pseudomonas aeruginosa* se presentaron porcentajes más bajos (38,8 %). Las carbapenemasas más frecuentes en enterobacterias fueron la KPC (n=574), seguida de la NDM (n=57); en *P. aeruginosa*, la VIM (n=229) y la KPC (n=114), y en *A. baumannii*, la OXA-23 (n=87). Se detectaron varias combinaciones de carbapenemasas, siendo la de KPC y VIM la más frecuente en *Pseudomonas* spp., y en enterobacterias.

**Conclusión.** La información obtenida a partir del Sistema Nacional de Vigilancia ha permitido conocer los perfiles y los mecanismos de resistencia a carbapenémicos de las cepas que están circulando en las instituciones de salud del país.

**Palabras clave:** farmacorresistencia microbiana; infecciones bacterianas; vigilancia; carbapenémicos; Enterobacteriaceae; *Acinetobacter*, *Pseudomonas*.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3432

Results of the national surveillance of antimicrobial resistance of Enterobacteriaceae and Gram negative bacilli in health care-associated infections in Colombia, 2012-2014

**Introduction:** The Colombian National Antimicrobial Resistance Monitoring System for the surveillance of healthcare-associated infections was set up to meet this problem in the third quarter of 2012.

**Objective:** To describe resistance profiles and laboratory-based surveillance based on the information collected by the System.

**Materials and methods:** We conducted a retrospective and descriptive study of the information notified to the Colombian Public Health Surveillance System (Sivigila), and in the Whonet databases covering the period from July 2012 to December 2014 provided by the primary data-generating units

#### Contribución de los autores:

María Victoria Ovalle: recolección de las bases de datos Whonet y análisis de la información sobre resistencia Sandra Yamile Saavedra: confirmación genotípica de los aislamientos

Melissa Hidalgo, Maria Nilse González y Carolina Duarte: confirmación fenotípica de los aislamientos

Mauricio Beltrán: análisis de la información sobre resistencia

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

in the country, as well as laboratory surveillance results from 1,642 phenotypic and genotypic tests on carbapenemase isolates (927 from Enterobacteriaceae, 614 from *Pseudomonas* spp. and 101 from *Acinetobacter* spp.).

**Results:** There was a significant increase in *Escherichia coli* resistance to third-generation cephalosporins (reaching 26.3% in ICUs and 22.5% in other hospital wards), and *Klebsiella pneumoniae* resistance to ertapenem also increased (reaching 14.6% in ICUs). *Acinetobacter baumannii* carbapenem resistance exceeded 50% in ICUs whereas *Pseudomonas aeruginosa* had lower carbapenem resistance (38.8%). KPC (n = 574) and NDM (n=57) were the most frequently occurring carbapenemases in Enterobacteriaceae, VIM (n=229) and KPC (n=114) in *P. aeruginosa*, and OXA-23 in *A. baumannii* (n=87); several carbapenemase combinations were identified, KPC + VIM being the most common in *Pseudomonas* spp. and Enterobacteriaceae.

**Conclusion:** The data from the surveillance of healthcare-associated infections revealed significant carbapenem resistance profiles and antimicrobial resistance mechanisms circulating in Colombian healthcare institutions.

**Key words:** Drug resistance, microbial; bacterial infections; surveillance; carbapenems; Enterobacteriaceae; *Acinetobacter*; *Pseudomonas*.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3432

La aparición y la rápida diseminación de microorganismos cada vez más resistentes a la acción de los antimicrobianos en los servicios de salud, se asocian con aumento de la morbilidad, la mortalidad. la estancia hospitalaria y los costos de la atención sanitaria (1). Por ello, en su estrategia mundial para la contención de esta problemática, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda estimular las medidas de prevención de las infecciones para retrasar la aparición de la resistencia, disminuir la diseminación de microorganismos resistentes y, así, reducir el impacto negativo de la resistencia a los antimicrobianos en los pacientes y en los costos de la atención sanitaria (2). En este contexto, la implementación de sistemas de vigilancia es el primer paso y parte fundamental de dicha estrategia.

En 2008, el Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia diseñó un modelo de vigilancia en salud pública que incluía las infecciones asociadas a la atención en salud, la resistencia antimicrobiana y el consumo de antibióticos como problemas prioritarios de salud pública a nivel nacional. En el 2012, el Instituto Nacional de Salud estableció una metodología para la implementación progresiva de estas estrategias de vigilancia y emitió la Circular 045, en la cual se establece la obligatoriedad de la notificación de estas situaciones en todo el territorio nacional.

Correspondencia:

María Victoria Ovalle, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: 220 7700, extensión 1421

movalle@ins.gov.co

Recibido: 28/07/16; aceptado: 14/12/16

Por otra parte, el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud se incorporó desde 2010 a la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (RELAVRA), cuyo objetivo es obtener información microbiológica confiable, oportuna y reproducible, con el fin de fortalecer la vigilancia mediante la instauración de programas sostenibles de garantía de la calidad.

En el marco del Programa de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana en las infecciones asociadas a la atención de salud, y con el uso de Whonet, el Grupo de Microbiología incluye la vigilancia de la resistencia a diferentes antimicrobianos en enterobacterias, bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos (*Staphylococcus* spp.) y *Enterococcus* spp.), así como la vigilancia de resistencias inusuales en diferentes bacterias.

El objetivo de este trabajo fue presentar los resultados obtenidos del Sistema Nacional de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana en las infecciones asociadas con la atención de salud, así como de la notificación a las bases de Whonet y la vigilancia por laboratorio de carbapenemasas a partir del 1° de septiembre de 2012 a 31 de diciembre de 2014 en enterobacterias y los bacilos Gram negativos no fermentadores *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. de pacientes atendidos en unidades de cuidados intensivos y otras áreas de hospitalización de las instituciones de salud que reportan al sistema de vigilancia.

#### Materiales y métodos

Se hizo un estudio descriptivo y retrospectivo con base en la información recolectada en el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública, Sivigila, proveniente de las unidades primarias generadoras de datos (UPGD) que estas remiten a las entidades territoriales correspondientes, las que, a su vez, las hacen llegar al Instituto Nacional de Salud.

Cada una de estas unidades recoge mensualmente los datos microbiológicos de los sistemas automatizados, utilizando el programa Whonet, versión 5.6 (OMS, 2014), previo control de calidad de las bases de datos.

El Sistema Nacional de Vigilancia viene funcionando desde el 1° de septiembre de 2012. En agosto de ese año, los departamentos de Antioquia, Valle del Cauca, Boyacá y Santander comenzaron a enviar la información (30 UPGD en total). En 2013, ingresaron al sistema de vigilancia los departamentos de Meta, Cundinamarca y los distritos de Bogotá y Barranquilla (137 UPGD en total) y, en 2014, se había alcanzado un número de 157 UPGD que notificaban en los ocho departamentos.

En el análisis de la información sobre la resistencia antimicrobiana, se utilizó el programa Whonet, versión 5.6, y se incluyó únicamente el primer aislamiento de cada paciente. Los perfiles de resistencia antimicrobiana se analizaron siguiendo las recomendaciones vigentes del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014) (3) para enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

#### Aislamientos y caracterización microbiológica

Además de esta vigilancia, el 1° de septiembre de 2012, el Grupo de Microbiología dio inicio al Programa de Vigilancia por el Laboratorio de la Resistencia Antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud, en cuyo marco se vigila la resistencia mediada por carbapenemasas en bacilos Gram negativos (enterobacterias, *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp.), la resistencia a vancomicina en *Staphylococcus* spp. y en *Enterococcus* spp., y resistencias inusuales en diferentes bacterias.

Entre el 1° de septiembre de 2012 y el 31 de diciembre de 2014, se recibieron en el Grupo de Microbiología 1.642 aislamientos (927 de enterobacterias, 614 de *Pseudomonas* spp. y 101 de *Acinetobacter* spp.) provenientes de 19 departamentos del país para la detección e identificación fenotípica y genotípica de carbapenemasas. Se confirmó la identificación y se determinó el perfil de sensibilidad de todos los aislamientos recibidos, utilizando el sistema automatizado Vitek 2 Compac® (bioMérieux, tarjeta AST-N082, AST N272 y AST N 271) y, además, la técnica

de difusión en disco (Kirby-Bauer). La interpretación de los resultados se ajustó a los parámetros vigentes del CLSI (3).

La detección fenotípica de carbapenemasas se hizo mediante el test modificado de Hodge, usando como indicadora la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, como control positivo la cepa *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 (positiva para KPC) y, como control negativo, la cepa *K. pneumoniae* ATCC BAA 1706. La detección de carbapenemasas de tipo serina de clase A se hizo mediante la prueba de sinergia con ácido fenilborónico (APB), usando como control positivo la cepa *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 (positiva para KPC).

Para la detección de carbapenemasas del tipo de las metalobetalactamasas, se empleó la prueba de sinergia con ácido etilendiaminotetracético-ácido mercaptoacético de sodio (EDTA/SMA) en todos los aislamientos y la cepa *K. pneumoniae* ATCC BAA 2146 (positiva para NDM) como control positivo.

#### Caracterización genotípica

El ADN de los aislamientos se obtuvo mediante lisis celular por ebullición. Para la detección de carbapenemasas, se recurrió a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional. La detección de los genes  $\mathit{bla}_{\scriptscriptstyle{\mathrm{KPC}}}$ ,  $\mathit{bla}_{\scriptscriptstyle{\mathrm{GES}}}$  y  $\mathit{bla}_{\scriptscriptstyle{\mathrm{VIM}}}$ (4) se hizo mediante PCR múltiple, y la de bla<sub>NDM</sub> (5),  $bla_{IMP}$  (6) y  $bla_{OXA-48}$  (7), con PCR simple. La presencia de carbapenemasas del tipo de las OXA de los subgrupos  $bla_{\rm OXA-23}$ ,  $bla_{\rm OXA-24/40}$ ,  $bla_{\rm OXA-51}$ ,  $bla_{\rm OXA-58}$  (8) y  $bla_{\rm OXA-143}$  (9) en *Acinetobacter* spp., se evaluó mediante PCR múltiple. Las mezclas para la reacción contenían: solución tampón para PCR 1X, 3 mM de MgCl<sub>a</sub> (PCR múltiple para OXA), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (PCR multiple para KPC, GES y VIM), y 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (PCR simple), 0,2 mM de dNTP y 1 U/µl de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Life Technologies) para la PCR múltiple y 0,5 U/µl de Tag ADN polimerasa (Invitrogen, Life Technologies) para la PCR simple.

Las condiciones de amplificación, las secuencias y la concentración de los iniciadores se describen en el cuadro 1. Las reacciones de PCR se realizaron en los termocicladores T100 y C1000 de Bio-Rad. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1,2 %, teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

#### Resultados

En el cuadro 2 se presentan los microorganismos más frecuentemente aislados entre 2012 y 2014,

Cuadro 1. Condiciones de amplificación, secuencias y concentración de iniciadores en la reacción en cadena de la polimerasa

Ensayo	Secuencias (5' – 3')	Concentración de iniciador y tamaño (pb)	Condiciones de amplificación			
PCR múltiple KPC, GES VIM	KPC F: TCGCTAAACTCGAACAGG KPC R: TACTGCCCGTTGACGCCCAATCC GES F: CTATTACTGGCAGGGATCG	0,4 μm (785 pb)	1 ciclo 35 ciclos	95 °C 5 minutos 95 °C 30 segundos 58 °C 45 segundos		
	GES R: CCTCTCAATGGTGTGGGT VIM F: GTTTGGTCGCATATCGCAAC	0,4 µm (594 pb)	4 siele	72 °C 1 minuto		
	VIM R: AATGCGCAGCACCAGGATAG	0,3 µm (382 pb)	1 ciclo	72 °C 8 minutos		
PCR NDM	Pre NDM F: CACCTCATGTTTGAATTCGCC Pre NDM R: CTCTGTCACATCGAAATCGC	0,4 µm (984 pb)	1 ciclo 30 ciclos	95 °C 5 minutos 95 °C 1 minuto 58 °C 1 minuto 72 °C 1 minuto		
			1 ciclo	72 °C 10 minutos		
PCR IMP	IMP F: GGAATAGAGTGGCTTAATTC IMP R: GCCAAGCTTCTATATTTGCG	0,6 µm (275 pb)	1 ciclo 35 ciclos	94 °C 10 minutos 94 °C 30 segundos 55 °C 45 segundos 72 °C 1 minuto		
			1 ciclo	72 °C 15 minutos		
PCR OXA-48	OXA-48 F: GCGTGGTTAAGGATGAACAC OXA-48 R: CATCAAGTTCAACCCAACCG	0,5 µm (438 pb)	1 ciclo 35 ciclos	95 °C 5 minutos 95 °C 30 segundos 58 °C 45 segundos 72 °C 1 minuto		
			1 ciclo	72 °C 8 minutos		
PCR múltiple subgrupos de	OXA-23-like F: GATCGGATTGGAGAACCAGA OXA-23-like R: ATTTCTGACCGCATTTCCAT	0,5 µm (501pb)	1 ciclo	95 °C 5 minutos		
OXA	OXA-24/40-like F: GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA OXA-24/40-like R: AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	0,5 µm (246 pb)	20 ciclos	05 °C 45 assumdes		
	OXA-51-like F: TAATGCTTTGATCGGCCTTG OXA-51-like R: TGGATTGCACTTCATCTTGG	0,5 μm (353 pb)	30 ciclos	95 °C 45 segundos 58 °C 1 minuto		
	OXA-58-like F: AAGTATTGGGGCTTGTGCTG OXA-58-like R: CCCCTCTGCGCTCTACATAC	0,5 μm (599 pb)	4 ciele	72 °C 1 minuto 30 segundos		
	OXA-143-F: TGGCACTTTCAGCAGTTCCT OXA-143-R: TAATCTTGAGGGGGCCAACC	0,7 μm (149 pb)	1 ciclo	72 °C 8 minutos		

pb: pares de bases

Cuadro 2. Prevalencia de los principales patógenos

Microorganismo			Microorgani	smos n (%)				
	Unidade	es de cuidados i	ntensivos	Otras áreas de hospitalización				
	2012 (n=3.033)	2013 (n=11.121)	2014 (n=29.716)	2012 (n=6.628)	2013 (n=22.524)	2014 (n=62.156)		
Klebsiella pneumoniae	447 (15)	1.825 (16)	4.705 (16)	717 (11)	2.823 (13)	7.383 (12)		
Escherichia coli	416 (14)	1.613 (15)	2.251 (16)	1.790 (27)	6.385 (28)	18.199 (29)		
Pseudomonas aeruginosa	304 (10)	1.134 (10)	2.649 (9)	490 (7)	2.141 (10)	4.737 (8)		
Staphylococcus aureus	279 (9)	1.016 (9)	2.560 (9)	798 (12)	2.437 (11)	6.941 (11)		
Staphylococcus epidermidis	231 (8)	801 (7)	1.973 (7)	305 (5)	753 (3)	2.523 (4)		
Candida albicans	149 (5)	318 (3)	992 (3)	167 (3)	324 (1)	1.013 (2)		
Enterococcus faecalis	132 (4)	327 (3)	1.048 (4)	354 (5)	790 (4)	2.766 (4)		
Enterobacter cloacae	106 (3)	397 (4)	1.085 (4)	246 (4)	761 (3)	1.945 (3)		
Stenotrophomonas maltophilia	80 (3)	288 (3)	544 (2)	59 (1)	241 (1)	431 (1)		
Acinetobacter baumannii	46 (2)	418 (4)	901 (3)	67 (1)	449 (2)	755 (1)		
Serratia marcescens	71 (2)	290 (3)	819 (3)	91 (1)	394 (2)	994 (2)		

discriminados según el tipo de servicio de salud del cual provenían. Se observó que la frecuencia de microorganismos tuvo un comportamiento idéntico durante los años de estudio. En las unidades de cuidados intensivos predominó *K. pneumonia*e, seguido de *E. coli, P. aeruginosa* y

Staphylococcus aureus, en tanto que en otras áreas de hospitalización predominó *E. coli*, seguido de *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Por otra parte, se observó un incremento en el número de microorganismos reportados.

En los cuadros 3 y 4 se presentan los perfiles de resistencia más frecuentes en las enterobacterias y en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, discriminados según las áreas de hospitalización (unidades de cuidados intensivos y otras). Es importante resaltar que el número de microorganismos sujetos a vigilancia durante 2012 fue mucho menor que el de los demás años, debido a que la vigilancia se inició a partir del mes de agosto de ese año.

Se observó un ligero incremento en la resistencia de E. coli a cefalosporinas de tercera generación en los dos tipos de servicios de atención hospitalaria, siendo mayor en las unidades de cuidados intensivos, con un rango de resistencia entre 20,8 y 26,5 % (CIM<sub>50</sub>=1-2  $\mu$ g/ml); específicamente, se presentó un incremento significativo en la resistencia a la ceftazidima, marcador de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, en los tres años de vigilancia (p<0,007). La resistencia a carbapenémicos en las unidades de cuidados intensivos tuvo un comportamiento similar en los años 2012 y 2014, con un promedio de resistencia de 1,8 % (CIM<sub>so</sub>=0,5-1 μg/ml), y sin diferencias significativas; sin embargo, se observó una ligera disminución en los porcentajes de resistencia en 2013.

En las otras áreas de hospitalización, se presentó un incremento significativo (p<0,03) en la resistencia a cefalosporinas de tercera generación durante el período vigilado, en tanto que en la resistencia a los carbapenémicos se observó una disminución significativa (p<0,003) en 2014, con un rango de resistencia que osciló entre 0,6 y 0,9 % ( $CIM_{50}$ =0,5-1  $\mu$ g/ml para ertapenem e imipenem, y  $CIM_{50}$ =0,25-8  $\mu$ g/ml para meropenem).

Klebsiella pneumoniae presentó porcentajes similares de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en los años de vigilancia, con un promedio de 37,5 % en las unidades de cuidados intensivos y de 36,8 % (CIM $_{50}$ =1-8 µg/ml) en otras áreas de hospitalización. La resistencia a carbapenémicos en las primeras aumentó significativamente (p<0,004): para ertapenem pasó de 9,3 % en 2012 a 14,6 % en 2014 (CIM $_{50}$ =0,5-1 µg/ml); sin embargo, en otras áreas de hospitalización, la resistencia fue menor comparada con la registrada en las unidades de cuidados intensivos, pues alcanzó una resistencia de 12,5 % (CIM $_{50}$ =0,5-4 µg/ml).

Se analizó la resistencia en *Providencia rettgeri*, ya que en esta enterobacteria se ha detectado el mayor número de metalobetalactamasas de tipo NDM durante la vigilancia, y se observó que, a pesar del bajo número de aislamientos notificados, en las unidades de cuidados intensivos se presentaron porcentajes elevados de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, con un promedio de 56,1 %, aunque sin diferencias significativas (CIM $_{50}$ =4-64 µg/ml) comparado con el de otras áreas de hospitalización, cuyo promedio de resistencia fue de 34,3 % (CIM $_{50}$ =1-8 µg/ml).

En *A. baumannii* se evidenció una mayor resistencia a carbapenémicos en las unidades de cuidados intensivos, con un incremento significativo en los tres años de vigilancia (p<0,02), que alcanzó un promedio de 53,8 % (CIM<sub>50</sub>=16 μg/ml) en 2014, en tanto que en otras áreas de hospitalización no se observó un incremento significativo en la resistencia a esta familia de antibióticos, la cual osciló entre 46,4 y 47,2 %; sin embargo, la CIM<sub>50</sub> para 2014 fue menor que la reportada en las unidades de cuidados intensivos (CIM<sub>50</sub>=1 μg/ml).

Los porcentajes de resistencia a carbapenémicos en P. aeruginosa fueron más altos en las unidades de cuidados intensivos, con una resistencia promedio de 32,4 % (CIM $_{50}$ =1-2  $\mu$ g/ml), que en las otras áreas de hospitalización, cuya resistencia promedio fue de 22,8 % (CIM $_{50}$ =1-2  $\mu$ g/ml).

En los datos reportados sobre resistencia antimicrobiana entre 2012 y 2014, se evidenciaron altos porcentajes de resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae*; en la figura 1 se presenta la tendencia de este fenotipo de resistencia a carbapenémicos durante los años de vigilancia, observándose en el primer año un alto porcentaje de resistencia, el cual alcanzó 11 %, en los dos tipos de servicio hospitalario considerados, a pesar del bajo número notificado de microorganismos. Se destaca la disminución de la resistencia a imipenem y meropenem en 2013, aunque la tendencia general al incremento de la resistencia a esta familia de antibióticos se mantuvo.

Según los datos del programa de vigilancia por laboratorio de la resistencia antimicrobiana en las infecciones asociadas a la atención de salud, *K. pneumoniae* fue la enterobacteria que más frecuentemente se identificó (n=468), seguida de *Enterobacter cloacae* (n=195), *E. coli* (n=110), *P. rettgeri* (n=44) y *Serratia marcescens* (n=43).

Entre las enterobacterias, la KPC fue la carbapenemasa más prevalente (70,3 %; n=574), seguida

Cuadro 3. Perfiles de resistencia en enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en las unidades de cuidados intensivos, 2012-2014

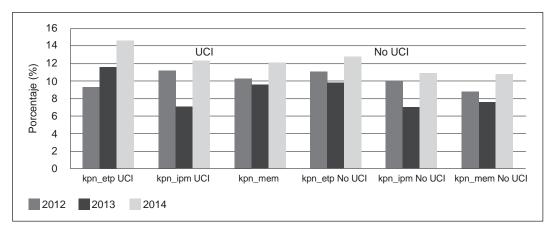
Unidades de cuidado intensivo												
Organismo/antimicrobiano		2012			2013			2014				
	% R	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	% R	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	% R	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>			
Escherichia coli		n=416			n=1.613			n=4.451				
Ampicilina-sulbactam	45,7	16	32	43,8	16	32	41,4	16	32			
Piperacilina-tazobactam	10,1	16	128	9,8	16	64	10,4	16	128			
Ceftazidima	18,5	1	16	26,5	1	32	24,6	1	16			
Ceftriaxona	16,4	1	64	24,6	1	64	24,7	1	64			
Cefotaxima	15,9	2	64	22,9	2	64	20,8	2	64			
Cefepime	9,5	2	8	15,7	4	32	12,4	2	32			
Aztreonam	16,1	4	32	21,2	4	32	24,7	4	32			
Ertapenem	2,5	1	2	1,9	1	1	2,2	5	1			
Imipenem	1,9	1	1	0,5	1	1	1,7	1	1			
Meropenem	1,5	25	1	0,9	1	1	1,3	1	1			
Amikacina	0,7	8	16	1,4	16	16	0,9	8	16			
Ciprofloxacina	32,1	1	4	36,9	1	4	35,1	1	4			
Trimetoprim-sulfametoxazol	46,3	2	16	49,2	2	8	46	2	16			
Klebsiella pneumoniae		n=447			n=1.825			n=47.705				
Ampicilina-sulbactam	42,6	8	32	48,2	16	32	47,5	16	32			
Piperacilina-tazobactam	21,7	16	128	25,1	16	128	27,8	16	128			
Ceftazidima	37,5	1	32	41,2	1	32	39,1	1	32			
Ceftriaxona	34,2	8	64	38,5	2	64	39,4	1	64			
Cefotaxima	36,9	2	64	35,6	2	64	35,5	2	64			
Cefepime	23,6	4	32	27,7	4	32	23,6	2	32			
Aztreonam	33,4	8	64	37,2	4	32	35,4	4	32			
Ertapenem	9,3	1	8	11,6	1	8	14,6	5	8			
Imipenem	11,2	1	4	7,1	1	1	12,3	1	16			
Meropenem	10,3	1	4	9,6	1	2	12,1	1	16			
Amikacina	6,1	8	16	6,1	16	16	4,8	8	16			
Ciprofloxacina	17,4	1	4	22,6	1	4	20,6	1	4			
Trimetoprim-sulfametoxazol	30,3	2	4	36,5	2	4	35,1	2	8			
Providencia rettgeri		n=5			n=10			n=28				
Ampicilina-sulbactam	100	32	32	66,7	32	32	64,7	32	32			
Piperacilina-tazobactam	20	64	128	40	16	128	17,4	16	128			
Ceftazidima	60	4	32	50	4	32	48,1	2	64			
Ceftriaxona	60	64	64	70	8	64	53,6	8	64			
Cefotaxima	60	64	64	50	2	64	53,8	64	64			
Cefepime	20	4	32	60	16	32	26,9	4	32			
Aztreonam	20	4	32	80	32	32	42,9	4	32			
Ertapenem	60	8	8	20	1	8	42,3	1	8			
Imipenem	75	8	16	33,3	1	16	13,3	1	16			
Meropenem	60	4	8	20	1	16	30,8	1	16			
Amikacina	40	32	64	30	16	64	17,9	8	64			
Ciprofloxacina	40	1	4	40	1	4	32,1	1	4			
Trimetoprim-sulfametoxazol	60	4	4	60	4	4	54,2	4	16			
Acinetobacter baumannii		n=46			n=418			n=901				
Ampicilina-sulbactam	16	2	32	41,6	16	32	35,4	8	32			
Ceftazidima	22,7	4	64	43,7	8	32	46,1	8	32			
Cefepime	39,1	8	64	61,4	32	32	49,7	16	64			
Imipenem	35,6	1	16	66,9	16	16	53	16	16			
Meropenem	40	1	16	69,2	16	16	54,7	16	16			
Amikacina	28,1	8	64	48,5	32	64	33,3	32	64			
Ciprofloxacina	34,8	5	4	59,9	4	4	49	1	4			
Pseudomonas aeruginosa		n= 304			n=1134			n=8.649				
Piperacilina-tazobactam	23	16	128	23,5	16	128	21,8	16	128			
Ceftazidima	25,5	4	64	20,6	4	32	22,1	4	32			
Cefepime	23,5	8	32	21,6	4	32	18,6	4	32			
Aztreonam	32,4	8	32	32,5	8	32	30	8	32			
Imipenem	38,8	2	16	34,7	2	16	33,2	2	16			
Meropenem	33,4	1	16	28,3	1	16	26,3	1	16			
Amikacina	21,7	8	64	14,9	16	64	14,3	8	64			
Gentamicina	20,2	4	16	20,6	4	16	18,8	4	16			
Ciprofloxacina	27,8	1	4	22,9	1	4	21,2	1	4			

<sup>%</sup> R: porcentaje de resistencia; n: número de aislamientos

**Cuadro 4.** Perfiles de resistencia en enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en otras áreas de hospitalización diferentes a las unidades de cuidado intensivo, 2012-2014

		Otras áreas de hospitalización									
Organismo/antimicrobiano		2012			2013			2014			
	% R	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	% R	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	% R	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>		
Escherichia coli		n= 1.790			n=6.385			n=18.199			
Ampicilina-sulbactam	45,7	16	32	39,8	16	32	36,9	16	32		
Piperacilina-tazobactam	10,1	16	128	6,5	16	32	7,3	16	64		
Ceftazidima	17,6	1	16	22,5	1	16	20,3	1	16		
Ceftriaxona	14,7	1	64	21,9	1	64	19,1	1	64		
Cefotaxima	17,1	2	64	18,8	4	32	16,5	2	64		
Cefepime	5,9	2	8	15,3	4	32	9,5	1	8		
Aztreonam	12,2	4	32	20	5	1	21,6	4	32		
Ertapenem	1,1	1	2	1,4	1	1	1,3	5	1		
·	1,1	1	1	0,7	1	1	0,9	1	1		
Imipenem											
Meropenem	1,5	25	1	0,7	8	16	0,7	1	1		
Amikacina	0,7	8	16	1,1	4	16	0,6	8	16		
Ciprofloxacina	31,5	1	4	34,8	1	4	33,3	1	4		
Trimetoprim-sulfametoxazol	42,6	2	16	47,8	2	16	45,1	2	16		
Klebsiella pneumoniae		n=717			n=2.823			n=7.383			
Ampicilina-sulbactam	45,5	16	32	49,7	16	32	48,5	16	32		
Piperacilina-tazobactam	24,1	16	128	22,2	16	128	26,9	16	128		
Ceftazidima	35,4	1	32	41,5	1	32	38,7	1	32		
Ceftriaxona	35,3	8	64	39,2	2	64	37,1	1	64		
Cefotaxima	32,6	2	32	34,9	4	32	36,6	2	64		
Cefepime	20,6	8	64	26	4	32	21,7	1	32		
Aztreonam	32,1	5	4	36,3	5	2	41,3	4	32		
	11,1	1	2	9,8	1	1	12,7	5	4		
Ertapenem	10	1	1	9,6 7	1	1	12,7	5 5	8		
Imipenem				-							
Meropenem	8,8	4	16	7,6	8	16	10,8	1	4		
Amikacina	5,6	2	16	5,3	4	16	4,5	8	16		
Ciprofloxacina	20,4	1	4	26,9	1	4	24,3	1	4		
Trimetoprim-sulfametoxazol	35,6	2	4	40,8	2	8	37,6	2	8		
Providencia rettgeri		n=8			n=32			n=73			
Ampicilina-sulbactam	50	8	32	20,7	16	32	54,5	32	32		
Piperacilina-tazobactam	0	16	16	16,7	16	128	23,8	16	128		
Ceftazidima	12,5	1	32	46,9	1	32	35,7	1	32		
Ceftriaxona	25	8	64	39,1	2	64	46,5	2	64		
Cefotaxima	33,3	2	64	19,4	4	64	51,4	8	64		
Cefepime	0	4	8	21,9	4	32	26,8	4	32		
Aztreonam	25	4	32	21,3	4	32	29,1	4	32		
Ertapenem	25	1	8	35	1	8	33,3	1	8		
Imipenem	16,7	1	8	9,4	1	8	25	1	8		
Meropenem	12,5	1	8	15,6	1	1	25,4	1	16		
Amikacina	25	8	64	37,5	16	64	9,7	8	32		
Ciprofloxacina	37,5	1	4	41,4	1	4	43,8	1	4		
Trimetoprim-sulfametoxazol	16,7	2	4		2	4	57,9	4	8		
Acinetobacter baumannii		n=67			n=449			n=755			
Ampicilina-sulbactam	13,5	2	32	35,2	8	32	27,2	8	32		
Ceftazidima	7,7	4	32	32,9	4	32	25,2	8	32		
Cefepime	23	8	32	48,9	16	32	44,5	16	64		
Imipenem	40	1	16	54,9	16	16	46,4	1	16		
Meropenem	50	2	16	51,6	16	16	47,2	1	16		
Amikacina	29,5	8	64	33	16	64	25,7	16	64		
Ciprofloxacina	38,5	5	4	53,9	4	4	44,5	10	4		
•	30,3		4	55,9		4	44,5		4		
Pseudomonas aeruginosa	45.4	n=490	400	40 =	n=2.141	400	400	n=4.737	400		
Piperacilina-tazobactam	15,1	16	128	18,5	16	128	18,3	16	128		
Ceftazidima	14,2	4	32	17,1	4	32	18,4	4	32		
Cefepime	14	8	32	17,8	4	32	14,8	4	32		
Aztreonam	24,1	8	32	27,1	8	32	27,4	8	32		
Imipenem	23,9	2	16	26,4	2	16	24,6	2	16		
Meropenem	20,1	1	16	22	1	16	20	1	16		
Amikacina	12,2	8	64	15,2	8	64	12,6	8	64		
Gentamicina	16,6	4	16	20,7	4	16	18,8	2	16		
Ciprofloxacina	21,6	1	4	24,5	1	4	22,2	5	4		

<sup>%</sup> R: porcentaje de resistencia; n: número de aisamientos



**Figura 1.** Fenotipo de la resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae* por área de hospitalización, 2012-2014 Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana en IAAS. Grupo de Microbiologia, Dirección Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud

Fenotipos de resistencia kpn\_etp: K. pneumoniae resistente a ertapenem; kpn\_ipm: K. pneumoniae resistente a imipenem; kpn\_mem: K. pneumoniae resistente a meropenem. UCI: Unidad de cuidados intensivos. No UCI: servicio de hospitalización. % R: porcentaje de resistencia

de las metalobetalactamasas NDM (7 %; n=57) y VIM (2,8 %; n=23); la KPC se detectó en la mayoría de especies analizadas, excepto en *Morganella morganii* y *Providencia* spp.; la NDM se identificó principalmente en *P. rettgeri* y *Klebsiella* spp., en tanto que la VIM se detectó en *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp., la IMP en *P. rettgeri* y la GES en *Citrobacter* spp. Las combinaciones identificadas fueron la de KPC y GES (n=6), KPC y VIM (n=6), y KPC y NDM (n=3). En 17,8 % (n=145) de los aislamientos la resistencia a carbapenémicos no se asoció con la producción de carbapenemasas (cuadro 5)

En *Pseudomonas* spp., las carbapenemasas más identificadas fueron la VIM (n=229) y la KPC (n=114). Las combinaciones identificadas fueron las de KPC y VIM (n=27), VIM y GES, y KPC y GES, en dos aislamientos cada una. En 33,7 % (n=191) de los aislamientos, la resistencia a carbapenémicos no se asoció con la producción de carbapenemasas (cuadro 6).

En *Acinetobacte*r spp. se observó el predominio de la carbapenemasa OXA-23 (n=87), y, además, se destacó la presencia de NDM en tres aislamientos y de las combinaciones de OXA-23 y NDM, KPC y OXA-23, y OXA-24 y OXA-143, en un aislamiento cada una (cuadro 7).

La distribución geográfica de las carbapenemasas durante el periodo analizado se presenta en la figura 2. Se observó que las carbapenemasas KPC, VIM y OXA-23 estaban ampliamente diseminadas; la NDM solo se identificó en cinco departamentos:

Antioquia, Cundinamarca (incluidos los aislamientos de Bogotá), Santander, Norte de Santander y Valle del Cauca. La carbapenemasa IMP se detectó únicamente en Bogotá y, la GES, en Antioquia.

La distribución geográfica de las combinaciones se presenta en la figura 3. La combinación de KPC y VIM fue la de mayor distribución en el país, seguida de NDM y KPC (Nariño, Norte de Santander y Valle del Cauca), y KPC y GES (Antioquia, Norte de Santander y Santander). Las combinaciones con las carbapenemasas OXA del subgrupo OXA-23 se identificaron en tres departamentos (una por departamento) y solo se detectó la de dos carbapenemasas oxacilinasas en Norte de Santander.

#### Discusión

Los sistemas de vigilancia han demostrado ser una estrategia efectiva para detectar tempranamente las cepas emergentes o aquellas con mecanismos de resistencia de importancia en salud pública; además, permiten conocer los perfiles de sensibilidad, la tendencia de la resistencia, la transmisión y la expresión de los genes de resistencia en varias poblaciones de bacterias, con lo cual es posible orientar las decisiones terapéuticas, la implementación de cambios en las prácticas de prescripción de antibióticos y las intervenciones de control de infecciones para contener la resistencia en el ámbito hospitalario (10).

Los datos que se presentan en este informe evidencian, en general, una mayor resistencia de los principales fenotipos de enterobacterias y bacilos

Cuadro 5. Distribución de carbapenemasas en enterobacterias

Microorganismo	n	S	R		M	ecanis	mo as	ociado	a la resis	stencia a	carbaper	némicos
							Carba	apenen	nasas			No asociado a
				KPC	NDM	VIM	IMP	GES	KPC y GES	KPC y VIM	NDM y KPC	⁻ carbapenemasas*
Citrobacter spp.	31	2	29	26	0	0	0	1	0	1	0	1
Enterobacter spp.	207	12	195	129	1	5	0	0	6	2	0	52
Escherichia coli	110	49	61	39	3	0	0	0	0	3	0	16
Klebsiella spp.	480	40	440	359	12	18	0	0	0	0	3	48
Kluyvera cryocrescens	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Morganella morganii	3	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Pantoea spp.	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteus mirabilis	4	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Providencia rettgeri	44	1	43	0	38	0	1	0	0	0	0	4
Providencia stuartii	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Serratia spp.	45	3	42	19	1	0	0	0	0	0	0	22
Total	927	111	816	574	57	23	1	1	6	6	3	145

n: número de aislamientos; S: sensible a carbapenémicos; R: resistente a carbapenémicos

Cuadro 6. Distribución de carbapenemasas en Pseudomonas spp.

Microorganismo	n	S	R			Meca	anismo	asociado a la	a resistencia a	a carbapenén	nicos
								No asociado a			
				VIM	KPC	NDM GES KPC y VIM KPC y GES VIM y GES					carbapenemasas*
Pseudomonas spp.	614	47	567	229	229 114 1 1 27 2 2					191	

n: número de aislamientos; S: sensible a carbapenémicos; R: resistente a carbapenémicos

Cuadro 7. Distribución de carbapenemasas en Acinetobacter spp.

Microorganismo	Microorganismo n S R Mecanismo asociado a la resistencia a carbapenémico									apenémicos	
					Carbapenemasas						
				OXA-23	NDM	KPC	VIM	KPC y OXA-23	NDM y OXA-23	VIM y OXA-23	OXA-24 y OXA-143
Acinetobacter spp.	101	4	97	87	3	2	1	1	1	1	1

n: número de aislamientos; S: sensible a carbapenémicos; R: resistente a carbapenémicos

Gram negativos no fermentadores en las unidades de cuidados intensivos. En el 2014, se observó en *E. coli* una resistencia a la ceftazidima, marcador de las cefalosporinas de tercera generación, de 24,6 % en las unidades de cuidados intensivos y de 20,3 % en otras áreas de hospitalización. Tales porcentajes superan lo reportado en el informe anual de 2010 por la Red de Monitoreo o Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos de la Organización Panamericana de la Salud, la cual incluye 20 países de Latinoamérica, pues la resistencia a la ceftazidima se ubicó en un rango

de 8 a 42 %, siendo Panamá el país con los más bajos porcentajes de resistencia (8 %), y Cuba y Perú, los que reportaron los porcentajes más altos (>30 %) (11).

En cuanto a *K. pneumoniae*, los más altos porcentajes de resistencia a carbapenémicos se registraron en las unidades de cuidados intensivos, observándose un incremento en la resistencia entre 2012 y 2014, ya que pasó de 9,3 a 14 %, porcentaje que superó lo reportado por otros autores (12,13), pero fue menor que el reportado por otras redes de

<sup>\*</sup>Aislamientos en los cuales la resistencia a carbapenémicos no se asoció con la producción de carbapenemasas

<sup>\*</sup>Aislamientos en los cuales la resistencia a carbapenémicos no se asoció con la producción de carbapenemasas

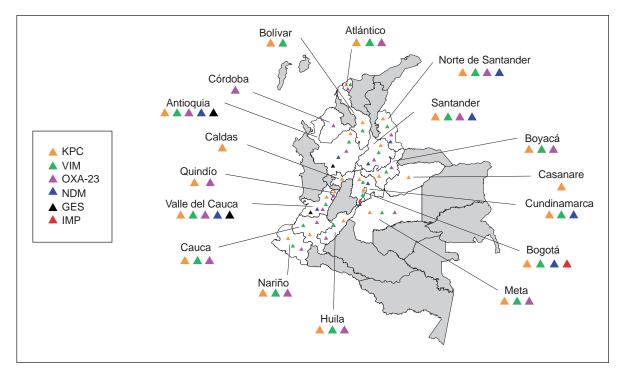
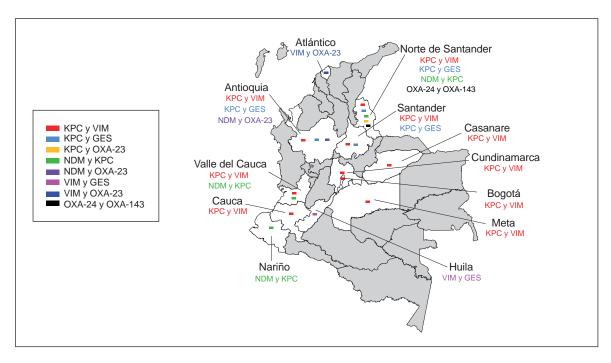


Figura 2. Distribución geográfica de los aislamientos de microorganismos productores de carbapenemasas en Colombia, septiembre de 2012 a diciembre de 2014



**Figura 3.** Distribución geográfica de los aislamientos de microorganismos productores de combinaciones de carbapenemasas en Colombia, septiembre de 2012 a diciembre de 2014

vigilancia locales, el cual fue de 17 a 20 %, en 2013 (14,15), aunque en otra áreas de hospitalización la resistencia fue menor (12,7 %).

La rápida diseminación de aislamientos de enterobacterias productoras de carbapenemasas se ha convertido en un problema de salud pública debido a las pocas opciones terapéuticas para tratar las infecciones que causan. En el 2006, se describió por primera vez en Colombia la presencia de KPC-2 (16) en pacientes hospitalizados y, en 2008, se reportó el primer brote por KPC-3 (17). Este incremento en la prevalencia ha ocurrido simultáneamente con el aumento en las tasas de resistencia a carbapenémicos en diferentes especies de enterobacterias (18). Colombia es considerada como una región endémica para KPC (18) y, en el presente informe, fue la carbapenemasa más frecuentemente detectada en estos microorganismos (70,3 %), lo cual coincide con lo reportado en otros sistemas de vigilancia como el de Chile (32 de 34 aislamientos de KPC analizados) (19) y el de Canadá (89,3 %; n=742 aislamientos) (20).

Con respecto a otras carbapenemasas, la NDM se reportó por primera vez en el país en 2012, con una prevalencia mayor de la reportada en otros estudios de vigilancia (Chile y Canadá) (20). En Colombia, se detectó principalmente en *P. rettgeri* (66,7 %) y en *Klebsiella* spp. (21,1 %), y sigue presentándose principalmente en *P. rettgeri* (21); también, se ha reportado en Argentina, Brasil, México y Uruguay (http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\_docman&task=doc\_view&gid=24472).

En el periodo de vigilancia analizado en el presente estudio, se detectó por primera vez la carbapenemasa IMP en un aislamiento clínico, aunque esta enzima ya había sido reportada en el país en 2006, en un aislamiento de *Salmonella enterica* proveniente de muestras de alimentos recolectadas en la costa Caribe (22). También, se detectó por primera vez la GES, la cual también se ha reportado en Brasil y Canadá (23,24).

Según los datos analizados, la resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* y *P. aeruginosa* fue mayor en las unidades de cuidados intensivos, con un promedio de 53,2 % y 32,4 %, respectivamente, siendo menores los porcentajes reportados en el sistema de vigilancia de Chile (42,7 % y 18,5 %, respectivamente) (25). Las carbapenemasas más frecuentemente detectadas en *Pseudomonas* spp fueron la VIM y la KPC, en una relación de 2 a 1, respectivamente. En Colombia estas dos enzimas son endémicas en *Pseudomonas* spp (26,27). Además, se detectó por primera vez la presencia de GES y un aislamiento portador de NDM, enzima que se considera poco frecuente en este microorganismo (28).

Por otra parte, en *Acinetobacter* spp la OXA-23 fue la carbapenemasa más frecuentemente identificada, lo que coincide con lo reportado en otros estudios en el país (29,30). Asimismo, se detectó por primera vez la OXA-143, enzima previamente identificada en Brasil, Estados Unidos y Honduras (31,32), así como la NDM y la KPC en *Acinetobacter* spp.

Durante el periodo de vigilancia analizado, se detectaron algunos casos de combinaciones en enterobacterias, Pseudomonas spp. y Acinetobacter spp., siendo la principal la de KPC y la VIM en Pseudomonas spp. y en enterobacterias, combinación que ya había sido reportada en el país (figura 3) (26,27,33-35). Por primera vez se detectaron en el país combinaciones de NDM (KPC y NDM, y NDM y OXA-23), aunque en otros países ya se habían reportado (36,37). Asimismo, se identificaron por primera vez las combinaciones de KPC y GES, VIM y GES, KPC y OXA-23, VIM y OXA-23, y OXA-24 y OXA-143. Por lo general, los aislamientos que presentan combinaciones tienen mayor resistencia, lo cual limita las opciones terapéuticas. Además, la amenaza de diseminación de este tipo de microorganismos en los hospitales es preocupante.

Estos hallazgos evidencian un problema de salud pública debido a la alta prevalencia de la resistencia de las enterobacterias y bacilos Gran negativos no fermentadores a los antibióticos de importancia hospitalaria.

Se detectó la circulación de KPC y VIM en los departamentos que hacen parte del sistema nacional de vigilancia. Aunque la presencia de NDM se reportó recientemente en el país, el número de casos va en aumento en las diferentes regiones y ha adquirido características endémicas.

De ahí, la necesidad de fortalecer las estrategias de vigilancia, prevención y control a nivel local, para evitar la diseminación de patógenos multirresistentes en el ambiente hospitalario. Asimismo, es indispensable mantener una articulación continua entre el laboratorio de microbiología, el comité de infecciones y el comité clínico, con el fin de detectar oportunamente estos perfiles de resistencia.

#### Agradecimientos

Al personal de los programas de vigilancia de la resistencia bacteriana en infecciones asociadas con la atención de salud y de los laboratorios departamentales de salud pública de Antioquia, Atlántico, Bolívar, Boyacá, Caldas, Cauca, Casanare, Córdoba, Cundinamarca, Huila, Meta, Nariño, Norte de

Santander, Quindío, Santander, Valle del Cauca, y a las secretarías distritales de salud de Bogotá y Barranquilla, así como a la red de hospitales públicos y privados que participan en la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana en dichas infecciones.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

#### **Financiación**

Estuvo a cargo del Instituto Nacional de Salud.

#### Referencias

- Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: Mortality, length of hospital stay, and healthcare costs. Clin Infect Dis. 2006;15:S82-9. https://doi.org/10.1086/499406
- Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos, 2001. Fecha de consulta: 19 de agosto de 2013. Disponible en: http://www.antibioticos.msssi.gob.es/PDF/resist\_OMS\_ estrategia\_mundial\_contra\_resistencias.pdf.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved standard. Twenty third information supplement. Document M100-S24. Wayne: CLSI; 2014.
- Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase gene by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother. 2012; 67:906-9. https://doi.org/10.1093/jac/dkr563
- Bonnin RA, Naas T, Poirel L, Nordmann P. Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo-β-lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2012;50:1419-21. https://doi.org/doi:10.1128/ JCM.06276-11
- Garza-Ramos U, Morfin-Otero R, Sader HS, Jones RN, Hernández E, Rodríguez-Noriega E, et al. Metallo-betalactamase gene bla(IMP-15) in a class 1 integron, In95, from Pseudomonas aeruginosa clinical isolates from a hospital in México. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:2943-6. https://doi.org/10.1128/AAC.00679-07
- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;70:119-23. https://doi. org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002
- Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp. Int J Antimicrob Agents. 2006;27:351-3. https://doi.org/10.1016/j. ijantimicag.2006.01.004
- Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp. Int J Antimicrob Agents. 2010;35:305. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.10.014

- Jones RN, Masterton R. Determining the value of antimicrobial surveillance programs. Diagn Microbiol Infect Dis. 2001;41:172-5. https://doi.org/10.1016/S0732-8893(01) 00318-2
- Organización Panamericana de la Salud. Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. 2010. Fecha de consulta: 2 de diciembre de 2016. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\_ docman&task=doc\_view&gid=24101&Itemid=).
- 12. Villalobos A, Díaz M, Barrero L, Rivera S, Henríquez D, Villegas M, et al. Tendencias de los fenotipos de resistencia bacteriana en hospitales públicos y privados de alta complejidad de Colombia. Rev Panam Salud Pública. 2011;30:627-33. https://doi.org/10.1590/S1020-49892011001200022
- 13. Grupo para el Estudio de la Resistencia de los Antimicrobianos en Medellín. Microorganismos. Fecha de consulta: 20 de diciembre de 2015. Disponible en: http:// www.grupogermen.org/microorganismos.html.
- Secretaría Distrital de Salud Pública de Bogotá. Boletín IAAS 2014. Fecha de consulta: 11 de diciembre de 2016. Disponible en: http://www.saludcapital.gov.co/DSP/ Resistencia%20Bacteriana/Boletines/Bolet%C3%ADn%20 IAAS%202014.pdf.
- 15. Grupo para el Control de Resistencia Bacteriana de Bogotá (GREBO). Boletín informativo, años 2012-2014. Fecha de consulta: 11 de diciembre de 2016. Disponible en: http://www.grebo.org/grebo\_site/jgrebo/index.php?option =com content&view=article&id=73&Itemid=469
- Villegas M, Lolans K, Correa A, Suárez C, López J, Vallejo M, et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from South America. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:2880-2. https://doi.org/10.1128/AAC. 00186-06
- 17. López JA, Correa A, Navon-Venezia S, Correa AL, Torres JA, Briceño DF, et al. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing Klebsiella pneumoniae strain. Clin Microbiol Infect. 2011;17:52-6. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03209.x
- Mojica MF, Correa A, Vargas DA, Maya JJ, Montealegre MC, Rojas LJ, et al. Molecular correlates of the spread of KPC-producing Enterobacteriaceae in Colombia. Int J Antimicrob Agents. 2012;40:277-85. https://doi.org/10. 1016/j.ijantimicag.2012.05.006
- Instituto de Salud Pública de Chile. Programa de Control de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud. Boletín de Resistencia Antimicrobiana, 2015. Fecha de consulta: 9 de diciembre de 2016. Disponible en: http://www.ispch.cl/sites/ default/files/BoletinRam-30112015A\_0.pdf
- Lefebvre B, Lévesque S, Bourgault AM, Mulvey MR, Mataseje, Boyd D, et al. Carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae in Quebec, Canada: Results of Laboratory Surveillance Program (2010-2012). PLoS One. 2015;10: e0125076. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125076
- 21. Saavedra SY, Duarte C, González MN, Ovalle MV. Emergencia de *Providencia rettgeri* NDM-1 en dos departamentos de Colombia, 2012-2013. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.05.011

- O'Mahony R, Quinn T, Drudy D, Walsh C, Whyte P, Mattar S. Antimicrobial resistance in nontyphoidal Salmonella from food sources in Colombia: Evidence for an unusual plasmid-localized class 1 integron in serotypes Typhimurium and Anatum. Microb Drug Resist. 2006;12:269-77. https://doi.org/10.1089/mdr.2006.12.269
- 23. Ribeiro VB, Falci DR, Rozales FP, Barth AL, Zavascki AP. Carbapenem-resistant GES-5-producing Klebsiella pneumoniae in Southern Brazil. Braz J Infect Dis. 2014; 18:231-2. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.12.002
- 24. Boyd D, Taylor G, Fuller J, Bryce E, Embree J, Gravel D, et al. Complete sequence of four multidrug-resistant MOBQ1 Plasmids harboring blaGES-5 isolated from Escherichia coli and Serratia marcescens persisting in a Hospital in Canada. Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Microb Drug Resist. 2015;21:253-60. https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0205
- Silva F, Cifuentes M, Pinto E. Resultados de la vigilancia de susceptibilidad antimicrobiana en Chile: consolidando una red. Rev Chil Infect. 2011;28:19-27. https://doi.org/10.4067/ S0716-10182011000100004
- Correa A, Del Campo R, Perenguez M, Blanco VM, Rodríguez-Baños M, Pérez F, et al. Dissemination of high-risk clones of extensively drug-resistant *Pseudomonas* aeruginosa in Colombia. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59:2421-5. https://doi.org/10.1128/AAC.03926-14
- 27. Vanegas JM, Cienfuegos AV, Ocampo AM, López L, del Corral H, Roncancio G, et al. Similar frequencies of Pseudomonas aeruginosa isolates producing KPC and VIM carbapenemases in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellín, Colombia. J Clin Microbiol. 2014;52: 3978-86. https://doi.org/10.1128/JCM.01879-14
- Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. Biomed Res Int. 2014;2014:249.856. https://doi.org/10.1155/2014/249856
- Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzmán AM, Woodford N, et al. Dissemination of Acinetobacter baumannii clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:2001-4. https://doi.org/10.1128/AAC.00226-07

- Saavedra SY, Núñez JC, Pulido IY, González EB, Valenzuela EM, Reguero MT, et al. Characterization of carbapenemresistant Acinetobacter calcoaceticus--A. baumannii complex isolates in a third level hospital in Bogotá, Colombia. Int J Antimicrob Agents. 2008;31:389-91. https://doi.org/10.1016/j. ijantimicag.2007.12.008
- Mostachio AK, Levin AS, Rizek C, Rossi F, Zerbini J, Costa SF. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. Int J Antimicrob Agents. 2012;39:396-401. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.021
- Zander E, Bonnin RA, Seifert H, Higgins PG. Characterization of blaOXA-143 variants in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii*. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58:2704-8. https://doi.org/10.1128/AAC.02618-13
- 33. Correa A, Montealegre MC, Mojica MF, Maya JJ, Rojas LJ, De La Cadena EP, et al. First report of a Pseudomonas aeruginosa isolate coharboring KPC and VIM carbapenemases. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56: 5422-3. https://doi.org/10.1128/AAC.00695-12
- 34. Saavedra SY, Duarte C, González MN, Realpe ME. Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de carbapenemasas de siete departamentos de Colombia. Biomédica. 2014;34:217-23. https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1685
- Rojas LJ, Mojica MF, Blanco VM, Correa A, Montealegre MC, De La Cadena E, et al. Emergence of Klebsiella pneumoniae coharboring KPC and VIM carbapenemases in Colombia. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:1101-2. https://doi.org/10.1128/AAC.01666-12
- 36. Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A, Pereira RM, et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. Braz J Med Biol Res. 2015;48:174-7. https://doi.org/10.1590/1414-431X20144154
- Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. J Antimicrobial Chemother. 2010;65:2253-4. https://doi.org/10.1093/jac/dkq273

#### ARTÍCULO ORIGINAL

## Variantes en los genes *TNFA*, *IL6* e *IFNG* asociadas con la gravedad del dengue en una muestra de población colombiana

Efrén Avendaño-Tamayo<sup>1,2</sup>, Omer Campo<sup>1</sup>, Juan Camilo Chacón-Duque<sup>1</sup>, Ruth Ramírez<sup>3</sup>, Winston Rojas<sup>1</sup>, Piedad Agudelo-Flórez<sup>4</sup>, Gabriel Bedoya<sup>1</sup>, Berta Nelly Restrepo<sup>3</sup>

- <sup>1</sup> Grupo de Genética Molecular, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
- <sup>2</sup> Departamento de Ciencias Básicas, Tecnológico de Antioquia Institución Universitaria, Medellín, Colombia
- <sup>3</sup> Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES, Sabaneta, Colombia
- <sup>4</sup> Facultad de Medicina, Universidad CES, Medellín, Colombia

**Introducción.** La composición genética del huésped determina, entre otros aspectos, el perfil clínico del dengue, lo cual se debería al efecto de variantes en los genes que codifican citocinas proinflamatorias. **Objetivo.** Evaluar la asociación entre las variantes de tres polimorfismos en los genes candidatos *TNFA*, *IL6* e *IFNG* con la gravedad del dengue en una población colombiana.

**Materiales y métodos.** Se evaluaron los polimorfismos rs1800750, rs2069843 y rs2069705 de los genes *TNFA*, *IL6* e *IFNG*, respectivamente, en 226 pacientes con dengue. Los genotipos se tipificaron usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP). Para determinar el riesgo de diferentes fenotipos del dengue, se compararon las frecuencias alélicas con la prueba de ji al cuadrado, y los genotipos y los haplotipos, con regresión logística. Por último, los análisis se ajustaron utilizando datos de autoidentificación o del componente genético ancestral.

Resultados. El alelo A del rs2069843, ajustado por autoidentificación, se asoció con casos de dengue hemorrágico en afrocolombianos. En la muestra completa, dicho polimorfismo, ajustado por componente genético ancestral, fue reproducible. Además, hubo asociaciones significativas entre las combinaciones alélicas GGT y GAC de los rs1800750, rs2069843 y rs2069705 en pacientes con dengue hemorrágico, con ajuste por componente genético ancestral y sin él. Además, la combinación alélica AGC produjo 58,03 pg/ml más de interleucina 6 que la GGC, independientemente de los componentes genéticos europeo, amerindio y africano.

**Conclusión.** Las variantes de los polimorfismos GGT y GAC de los rs1800750, rs2069843 y rs2069705 en los genes *TNFA*, *IL6* e *IFNG*, respectivamente, se correlacionaron con la gravedad del dengue en esta muestra de población colombiana.

Palabras clave: dengue/genética; citocina; genotipo; reacción en cadena de la polimerasa; polimorfismo (genética); Colombia

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3305

### Variants in the *TNFA*, *IL6* and *IFNG* genes associated with dengue severity in a sample of Colombian population

**Introduction:** The genetic makeup of the host contributes to the clinical profile of dengue. This could be due to the effect of variants in the genes encoding pro-inflammatory cytokines.

**Objective:** To evaluate the association between the variants of three polymorphisms in *TNFA*, *IL6* and *IFNG* candidate genes with dengue severity in a sample of Colombian population.

**Materials and methods:** We evaluated the rs1800750, rs2069843, and rs2069705 polymorphisms in *TNFA*, *IL6* and *IFNG* candidate genes, respectively, in 226 patients with dengue infection. The genotypes were typed using both polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). To determine the risk of different dengue phenotypes, we compared allele frequencies with chisquare and genotypes and haplotypes using logistic regression. Finally, these analyzes were adjusted with data from self-identification or the ancestral genetic component.

#### Contribución de los autores:

Berta Nelly Restrepo: concepción de la idea de investigación, contribución con materiales, reactivos y herramientas analíticas, escritura del manuscrito

Winston Rojas: contribución con materiales, reactivos y herramientas analíticas

Efrén Avendaño Tamayo: escritura del manuscrito

Gabriel Bedoya: contribución con materiales, reactivos y herramientas analíticas, supervisión del análisis de datos

Todos los autores concibieron y diseñaron los experimentos.

**Results:** The A allele in the rs2069843 polymorphism, adjusted by self-identification, was associated with dengue hemorrhagic fever cases in Afro-Colombians. In the entire sample, this polymorphism, adjusted by the ancestral genetic component, was reproducible. In addition, there were significant associations between GGT and GAC allelic combinations of rs1800750, rs2069843, and rs2069705 in dengue hemorrhagic fever patients, with and without adjustment by ancestral genetic component. Additionally, the AGC allelic combination produced 58.03 pg/ml of interleukin-6 more than the GGC combination, regardless of European, Amerindian and African genetic components.

**Conclusions:** The variants of GGT and GAC polymorphisms of rs1800750, rs2069843, and rs2069705 in the *TNFA*, *IL6* and *IFNG* genes, respectively, were correlated with the susceptibility to dengue severity in a sample of Colombian population.

**Key words:** Dengue/genetics; cytokines; genotype; polymerase chain reaction; polymorphism, genetic; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3305

El dengue es una enfermedad febril aguda causada por el virus del dengue (DENV), el cual es transmitido por la picadura de mosquitos del género *Aedes* (1). Esta virosis es endémica en más de 100 países de zonas tropicales y subtropicales del mundo (2). Según datos del Instituto Nacional de Salud, en Colombia, el dengue es endemo-epidémico, con un promedio anual de más de 60.000 casos confirmados (3).

Su espectro de manifestaciones clínicas varía desde las formas indiferenciadas o leves hasta las graves. Cualquiera de los serotipos (DENV-1 a 4) puede causar la enfermedad grave (4), caracterizada por extravasación del plasma, hemorragias y trombocitopenia, siendo la extravasación del plasma el rasgo más importante porque determina la gravedad de la infección (5).

Los mecanismos involucrados en el desarrollo de las formas graves no son del todo claros. Se ha postulado que los factores virales (6,7), el hecho de que la infección haya estado precedida de otra causada por un serotipo diferente (8), y factores asociados con el huésped, entre ellos los genéticos, pueden influir en la proclividad a presentar el dengue grave (8-10).

Las citocinas tienen un papel importante en la inmunopatogenia del dengue y algunas se han asociado con la gravedad de la enfermedad (11-13), tal como se ha reportado para el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), la interleucina 6 (IL-6) y el interferón (IFN- $\gamma$ ) (14,15). Sus niveles de producción pueden estar influenciados por el componente genético ancestral, como se ha demostrado previamente (10).

Correspondencia:

Efrén Ávendaño-Tamayo, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Calle 62 N° 52-59, torre 2, laboratorio 430. Medellín. Colombia

Teléfono: (574) 219 6467; fax: (574) 219 6469

efren. avendano@udea.edu.co

Recibido: 29/03/16; aceptado: 14/12/16

La intensidad de la reacción inmunitaria depende en gran medida del control de la expresión génica y, desde esa perspectiva, puede entenderse la importancia de las diferencias individuales en el riesgo genético frente a la gravedad del dengue.

La expresión de los genes *TNFA*, *IL6* e *IFNG* fue elevada en casos de dengue hemorrágico, pero este grupo de transcriptos no siempre se expresaron en el mismo grupo étnico (16,17).

Los polimorfismos genéticos con efecto sobre la regulación de la transcripción se han relacionado con la producción de citocinas y la gravedad del perfil clínico (18). Hay diferencias sustanciales entre distintas poblaciones en las frecuencias alélicas de algunos de ellos debido al efecto de la mezcla genética (19), por lo cual debe considerársela como una factor de confusión.

El gen *IL6*, localizado en el cromosoma 7p21, codifica la citocina IL-6, mediadora de la fiebre y reguladora negativa de la coagulación y la fibrinólisis (20). Las variantes de este gen han sido candidatas exitosas en la búsqueda de variantes puntuales con efecto sobre el desarrollo de los signos y los síntomas del dengue (21). Por ejemplo, se ha reportado que el polimorfismo -714 G/C en la región promotora afecta su transcripción, incrementándola en los casos de dengue que progresaron en gravedad (20,22), en tanto que el genotipo -714 G/G demostró ser un factor protector (23).

El gen *TNFA*, localizado en el cromosoma 6, codifica para la citocina TNF-α que regula la diferenciación, la proliferación, la apoptosis de células infectadas, el metabolismo de los lípidos y la coagulación, y participa en la reacción inmunitaria innata y en la humoral (20). Las frecuencias del alelo -308 A y del haplotipo -238 *TNFA/LTA* fueron mayores en los casos de dengue hemorrágico (24) en población venezolana y tailandesa, respectivamente (18,20). Localizado en el cromosoma 12, el gen *IFNG* codifica

la citocina IFN-γ, fundamental en la defensa contra el virus (25). La variante -1615 C/T en la región promotora, se asoció con niveles séricos altos de IFN-γ, y la variante T/T del polimorfismo llamado rs2430561 (*reference sequence*, rs), fue más frecuente en los casos de dengue hemorrágico (26).

En el presente estudio se propuso determinar el grado de asociación de las variantes genéticas evaluadas con la infección o la progresión del dengue, variantes que, después de comprobarse el significado biológico de las asociaciones, podrían usarse como marcadores moleculares de sensibilidad o pronóstico. Dado que en estudios anteriores no se ha considerado el componente ancestral, el objetivo fue evaluar la relación entre las variantes de tres polimorfismos en tres genes de citocinas con la gravedad del dengue, en una muestra de población colombiana.

#### Materiales y métodos

#### Tipo de estudio y población de estudio

Se hizo un estudio prospectivo de corte transversal. La población de estudio estuvo constituida por 226 pacientes con diagnóstico de dengue. Los casos se captaron a partir de los registros de la vigilancia activa de pacientes con síndrome febril de siete días o menos de evolución que consultaron en varias instituciones de salud de los departamentos de Antioquia y Chocó en el período de agosto de 2008 a noviembre de 2009. Estos departamentos se eligieron por su reconocido contraste poblacional en cuanto a su composición genética ancestral (27). La gota gruesa positiva para malaria fue criterio de exclusión de caso.

La clasificación de las formas clínicas de dengue se hizo según los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1997, la cual clasificaba los casos en fiebre por dengue y dengue hemorrágico (1,28).

#### Diagnóstico de infección

La confirmación en el laboratorio de la infección por DENV se hizo mediante la detección de anticuerpos IgM específicos contra el virus en todas las muestras de suero obtenidas en la fase aguda y en 100 muestras obtenidas en la fase de convalecencia de los pacientes que fueron a la segunda toma de la muestra.

Las muestras se procesaron con una prueba comercial (ELISA de captura - Dengue IgM Panbio™, Sinnamon Park, Australia), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Esta prueba

tiene una sensibilidad en la fase aguda de 82,2 % ( $IC_{95\%}$  78-87), y de 93,7 % ( $IC_{95\%}$  90-96) en la fase convaleciente, y una especificidad de 87,8 % ( $IC_{95\%}$  82-93) (29).

En 45 de los pacientes se detectó el genoma viral en la muestra de la fase aguda mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR), usando el protocolo establecido por Lanciotti (30) y adaptado por Harris (31) (cuadro suplementario 1 disponible en: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3305). El número de pruebas dependió de la disponibilidad de los reactivos.

Además, se detectaron anticuerpos IgG con un estuche comercial (Dengue IgG Capture ELISA™, Panbio, Sinnamon Park, Australia) en la muestra de la fase aguda, con el fin de determinar la infección secundaria y la primaria según la presencia o no de estos anticuerpos. Esta prueba clasifica correctamente 67 % de los casos con infección secundaria por dengue (29).

Los sueros obtenidos de los pacientes fueron centrifugados y conservados a -20 °C para, finalmente, almacenarlos a -70 °C hasta su procesamiento en los grupos de investigación de genética molecular de la Universidad de Antioquia y del Instituo Colombianao de Medicina Tropical. Los niveles de las citocinas TNF-α, IL-6 e IFN-γ se midieron en la muestra de suero de la fase aguda de la enfermedad, utilizando estuches comerciales y siguiendo las instrucciones del proveedor (Quantikine HS-High Sensitivity™, R & D Systems, Minneapolis, MN).

### Extracción de ADN y tipificación de variantes en genes candidatos

El ADN se extrajo de una muestra de sangre de 5 ml mediante el método fenol-cloroformo (32). Las variantes rs1800750, rs2069843 y rs2069705 se tipificaron mediante ensayos de reacción en cadena de la polimerasa combinados con polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Los genes candidatos se seleccionaron con base en los estudios de fisiopatología del dengue citados en la introducción (11-18,20-22,24,26). Los cebadores utilizados están detallados en el cuadro suplementario 1. Los genotipos se determinaron por la ausencia o presencia de los sitios de corte usando las endonucleasas Tasl, Eco88I y Hpal en los rs1800750 G/A, rs2069843 G/A y rs2069705 C/T, respectivamente. Los alelos de corte "A", "G"

y "T" generaron, en su orden, los fragmentos de 214 pb, 579 pb, 104 pb, 196 pb, 220 pb y 54 pb. El tiempo de incubación con enzimas se determinó de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Por último, los fragmentos fueron resueltos en electroforesis con geles de agarosa al 2,5 %.

### Marcadores informativos de componente genético ancestral

Con base en los mayores valores de delta entre las frecuencias alélicas de los marcadores del componente genético ancestral (Ancestry-Informative Markers, AIM) en poblaciones ancestrales continentales presentadas en el cuadro suplementario 2 disponible en: https://doi.org/10.7705/biomedica. v34i2.3305, se seleccionaron los 19 AIM detallados en el cuadro suplementario 3 disponible en: https:// doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3305. los cuales se usan para calcular los porcentajes individuales de componente ancestral de forma similar a la empleada por Chacón o Shriver y Parra (33-35). En general, estos se amplificaron mediante PCR, y tanto los polimorfismos de inserción y deleción como los que requirieron el uso de RFLP se resolvieron en electroforesis capilar (ABI-310) y en geles de agarosa.

#### Análisis

Las variantes génicas de los pacientes con dengue se compararon con las de aquellos con dengue hemorrágico; se comparó, asimismo, entre infección primaria y secundaria, presencia y ausencia de trombocitopenia, y según los niveles séricos del TNF- $\alpha$ , la IL-6 y el IFN- $\gamma$ , en la muestra de la fase aguda.

La base de datos se elaboró en Microsoft Excel. La comparación de las variables dicotómicas entre grupos se hizo mediante la prueba de ji al cuadrado, y la de las variables continuas, usando la prueba U de Mann-Whitney, ambas del paquete SPSS™ (Statistical Package for the Social Sciences), versión 22.

La prueba de normalidad utilizada fue la de Kolmogorov-Smirnov. Con la prueba de ji al cuadrado, se evaluaron las diferencias entre las frecuencias alélicas calculadas a partir de los genotipos con el programa Arlekin 3.5 y, las desviaciones genotípicas del equilibrio de Hardy-Weinberg, con Genpop V4. Con el programa Admixmap 3.8, se determinó la composición genética ancestral promedio e individual a partir de los AIM mediante un algoritmo bayesiano (36).

Para evaluar las asociaciones de genotipos y combinaciones alélicas inferidas a partir de los genotipos, se calcularon la razón de probabilidades (odds ratio, OR), el intervalo de confianza (IC) del 95 % y el nivel de significación (valor de p menor de 0,05) mediante regresiones logísticas utilizando máxima verosimilitud en el lenguaje de programación R en interface con el programa SNPstat 2.14.

Además, se ensayaron los modelos de herencia (codominante, dominante, recesivo y sobredominante). Para validar y contrastar las asociaciones, la prueba de ji al cuadrado se hizo sin estratificación por autoidentificación y con ella, y las regresiones logísticas se hicieron primero sin ajuste y, posteriormente, con ajuste considerando un componente genético ancestral (europeo, amerindio o africano) a la vez.

#### Consideraciones éticas

El proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto Colombiano de Medicina Tropical -Universidad CES, y el consentimiento informado fue aceptado y firmado por todos los participantes.

#### Resultados

#### Descripción de la población

La descripción de los pacientes de estudio se presenta en el cuadro 1. Se incluyeron 226 casos confirmados de dengue, sin diferencias en la distribución por sexo. Por autoidentificación, hubo más afrocolombianos que mestizos.

El diagnóstico de dengue se confirmó en 97,8 % (221/226) de los casos mediante la presencia

Cuadro 1. Descripción de los pacientes captados para este estudio

Parámetro	Detalle	n	%
ELISA IgM1 <sup>a</sup>	Positivo	194	85,8
Seroconversión de IgM	Positivo	27	11,9
RT-PCR <sup>a</sup>	Positivo	5	2,2
Formas clínicas	FD⁵	204	90,3
	DH <sup>c</sup>	22	9,7
Tipo de infección	Primaria	134	60,4
	Secundaria	88	39,6
Autoidentificación	Mestizo	104	46,0
	Afrocolombiano	122	54,0
Sexo	Hombres	110	48,7
	Mujeres	116	51,3
Edad (años)	Promedio±DE	24,5±18,8	

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Prueba realizada en muestras de fase aguda

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> FD fiebre por dengue

<sup>°</sup>DH: dengue hemorrágico

de anticuerpos IgM, y 27 de ellos tuvieron seroconversión de IgM entre la muestra de la fase aguda y la de la fase de convalecencia, y en 2,2 % (5/226) mediante RT-PCR. Se identificaron los serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-3. Según el diagnóstico de la forma clínica, 22 tuvieron dengue hemorrágico y, de ellos, 17 eran mestizos y solo cinco eran afrocolombianos (p=0,003). En cuanto a la procedencia geográfica, 21 casos fueron de Antioquia y solo uno del Chocó.

Aunque la frecuencia de infección secundaria fue mayor en los casos de dengue hemorrágico que en los de fiebre por dengue (57 y 38 %, respectivamente), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Los signos clínicos, así como los niveles de citocinas y trombocitopenia, se resumen en el cuadro 2. Se presentó trombocitopenia en 47,30 % de los afrocolombianos y en 66,70 % de los mestizos, lo que corresponde a una diferencia de 19,4 %. Con relación a los niveles séricos de citocinas, se observó un promedio mayor de IL-6 e IFN- $\gamma$  en pacientes afrocolombianos, comparado con el de los mestizos, pero, en promedio, los niveles de TNF $\alpha$  fueron similares entre los dos grupos étnicos.

Con el fin de observar mejor las diferencias, se presentaron los promedios con sus respectivas desviaciones estándar; sin embargo, al aplicar el cálculo estadístico para evaluar las diferencias de citocinas entre grupos étnicos, se usaron las medianas en una prueba U de Mann-Whitney.

#### Composición genética ancestral

Los dos grupos étnicos presentaron algún grado de mezcla genética ancestral. En los afrocolombianos, el componente europeo fue, en promedio, de 0,150, con una desviación estándar de  $\pm$  0,125, el amerindio fue de 0,098  $\pm$  0,121 y el africano fue de 0,752  $\pm$  0,184. Por el contrario, los mestizos tuvieron 0,652  $\pm$  0,100 de componente europeo, 0,193  $\pm$  0,075 del amerindio y 0,155  $\pm$  0,081 del africano (cuadro suplementario 4 disponible en: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3305).

#### Tipificación en los genes candidatos

En los resultados de este estudio, ningún polimorfismo en los genes candidatos se excluyó del análisis porque no hubo alelos de menor frecuencia (Minor Allele Frequency, MAF) por debajo de 1 %. Además, una vez hechos los ajustes considerando la autoidentificación, ninguno de los loci estuvo por fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg. Asimismo, la tasa de datos perdidos fue mínima. El rs1800750 en la región del TNFA se vio por fuera del equilibrio, lo cual ocurrió solo cuando la muestra de colombianos (afrocolombianos y mestizos) fue tratada como una sola población. lo cual es congruente con un efecto de Wahlund (37). Las frecuencias alélicas de los rs1800750, rs2069843 y rs2069705 en la muestra completa fueron 0,0333, 0,1134 y 0,4667, respectivamente (cuadro suplementario 5 disponible en: https://doi. org/10.7705/biomedica.v34i2.3305).

#### Asociación de alelos con dengue hemorrágico

Los alelos de menor frecuencia para cada polimorfismo rs1800750, rs2069843 y rs2069705, de los genes candidatos *TNFA*, *IL6* e *IFNG*, respectivamente, en los casos de dengue hemorrágico y fiebre por dengue, se muestran en el cuadro 3. Allí se presentan las frecuencias alélicas calculadas en la muestra completa y en los grupos estratificados con los datos de autoidentificación. Hubo una sola asociación significativa entre dichas frecuencias alélicas.

Cuadro 2. Descripción de los pacientes captados para este estudio

Parámetro	А	frocolombia	ino			Mestizo			Valor de p para
	FD <sup>a</sup> n=117	DH⁵ n=5	Total n=122	Valor p	FD <sup>a</sup> n=87	DH⁵ n=17	Total n=104	р	afrocolombiano/ mestizo
IL-6	21,75±59,65	6,62±8,58	21,08±58,42	0,480	10,49±49,96	19,05±62,67	11,80±51,9	0,156	FD <sup>a</sup> =0,000 DH <sup>b</sup> =0,168 Total=0,000
TNF	3,90±6,20	6,78±8,46	4,02±6,29	0,364	4,64±6,94	2,81±3,85	4,34±6,56	0,454	FD <sup>a</sup> =0,688 DH <sup>b</sup> =0,337 Total=0,946
IFNγ	38,25±130,31	0,44±0,60	36,59±127,63	0,993	19,20±93,99	0,00±0,00	16,06±86,18	0,090	FD <sup>a</sup> =0,049 DH <sup>b</sup> =0,010 Total=0,008
Trombocitop	penia	47,30 %				66,70 %		0,012	

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> FD: fiebre por dengue; <sup>b</sup> DH: dengue hemorrágico. Se muestran los promedios.

c± desviación estándar. Valor de p en la prueba U de Mann Whitney

En el grupo de pacientes afrocolombianos, el alelo "A" en la región del rs2069843 del gen IL6, se observó con gran frecuencia en los casos de dengue hemorrágico en comparación con los de fiebre por dengue (40 y 11 %, respectivamente;  $OR=5,394;\ IC_{95~\%}\ 2,565-11,34;\ p<0,0001).$  Este alelo (A) tuvo un comportamiento similar en la muestra completa y en el grupo de pacientes mestizos, sin embargo, las diferencias no fueron significativas. Tampoco fueron significativas las demás diferencias en las frecuencias alélicas de rs1800750 y rs2069705.

### Asociación de genotipos en pacientes con dengue hemorrágico

Cuatro señales importantes se identificaron en las frecuencias genotípicas y se presentan en el cuadro 4. La frecuencia del genotipo "G/A" en la región del rs2069843 fue significativamente más alta en pacientes con dengue hemorrágico que en aquellos con dengue por fiebre, ajustada por componente genético ancestral africano (34,8 % Vs. 15,8 %; OR=3,99; IC<sub>95%</sub> 1,45-11,00; p=0,026) y por el europeo (OR=3,96; IC<sub>95%</sub> 1,43-10,97; p=0,028). Además, el mismo genotipo ajustado por el componente

Cuadro 3. Asociación de alelos con dengue hemorrágico en la muestra completa y ajustada por autoidentificación

Gen SNP	Alelos		Muesti	a completa	Autoidentificación y formas clínicas						
			Forma	as clínicas	Afrocolombianos				Mestizos		
		FD⁵	DH°	<b>OR</b> <sup>d</sup>	FD⁵	DH°	<b>OR</b> <sup>d</sup>	FDb	DH°	OR <sup>d</sup>	
			-	(IC <sub>95%</sub> ) <sup>e</sup>			(IC <sub>95%</sub> ) <sup>e</sup>	_	-	(IC <sub>95%</sub> ) <sup>e</sup>	
			-	p <sup>f</sup>			<b>p</b> <sup>f</sup>	_	_	$\mathbf{p}^{f}$	
TNFA rs1800750	А	0,04	0,04	1 (0,2430-4,116) 1	0	0,03	0,1386 (0,007061-2,720) 0,08	0,04	0,06	1,532 (0,4187-5,604) 0,52	
<i>IL6</i> rs2069843	Α	0,09	0,17	2,071 (0,8753-4,900) 0,09	0,11	0,40	5,394 (2,565-11,34) <0,0001 <sup>9</sup>	0,06	0,11	1,936 (0,6869-5,458) 0,2	
<i>IFNG</i> rs2069705	Т	0,47	0,57	1,495 (0,8558-2,611) 0,16	0,50	0,47	1,128 (0,6474-1,964) 0,67	0,48	0,58	1,496 (0,8560-2,615) 0,16	

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> SNP: polimorfismo de nucleótido simple; <sup>b</sup>FD: fiebre por dengue; <sup>c</sup>DH: dengue hemorrágico; <sup>d</sup> OR: *Odds Ratio;* <sup>e</sup> IC<sub>95%</sub>: intervalo de confianza de 95 %; <sup>f</sup> Valor de p en la prueba de ji al cuadrado; <sup>g</sup> Asociación significativa

Cuadro 4. Asociación de genotipos con dengue hemorrágico en la muestra completa ajustada por componente ancestral

Gen	Genotipo	Formas	clínicas	Sin ajuste	Ajustado por componente africano	Ajustado por componente europeo	Ajustado por componente amerindio
SNPª	-	FD⁵n (%)	DH°n (%)	OR <sup>d</sup> (IC <sub>95%</sub> ) <sup>e</sup> p <sup>f</sup>			
TNFA	G/G	186 (92,5)	21 (91,3)	1	1	1	1
rs1800750	A/G	15 (7,5)	2 (8,7)	1,18 (0,25-5,52) 0,84	1,04 (0,21-5,01) 0,96	1,04 (0,21-5,01) 0,96	1,24 (0,26-5,85) 0,79
	A/A	0(0)	0 (0)	N/A <sup>g</sup>	N/A <sup>g</sup>	N/A <sup>g</sup>	N/A <sup>g</sup>
IL6	G/G	168 (83,2)	15 (65,2)	1	1	1	1
rs2069843	G/A	32 (15,8)	8 (34,8)	2,80 (1,10-7,15) <sup>1</sup> 0,10	3,99 (1,45-11,00) 0,03 <sup>h</sup>	3,96 (1,43-10,97) 0,03 <sup>h</sup>	2,85 (1,10-7,33) <sup>1</sup> 0,10
	A/A	2 (1)	0 (0)	N/A <sup>g</sup>	N/A <sup>g</sup>	N/A <sup>g</sup>	N/A <sup>g</sup>
IFNG	C/C	60 (29,9)	4 (17,4)	1	1	1	1
rs2069705	T/C	93 (46,3)	12 (52,2)	1,94 (0,60-6,28) 0,41	2,13 (0,64-7,05) 0,35	1,95 (0,60-6,40) 0,44	2,21 (0,66-7,41) 0,29
	T/T	48 (23,9)	7 (30,4)	2,19 (0,60-7,91) 0,41	2,31 (0,63-8,54) 0,35	2,09 (0,57-7,64) 0,44	2,55 (0,68-9,56) 0,29

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> SNP: polimorfismo de nucleótido simple; <sup>b</sup> FD: fiebre por dengue; <sup>c</sup>DH: dengue hemorrágico; <sup>d</sup>OR: *Odds Ratio*; IC<sub>95%</sub>: intervalo de confianza al 95%; <sup>f</sup> Valor de p de la regresión logística; <sup>g</sup> N/A: no fue calculado; <sup>h</sup> Asociación significativa; <sup>l</sup> IC no pasa por uno

amerindio (OR=2,85; IC $_{95\%}$  1,10-7,33; p=0,10) y sin ajuste por el componente ancestral (OR=2,80; IC $_{95\%}$  1,10-7,15; p=0,10) mostró, en ambos, intervalos de confianza de 95 % significativos, aunque el valor de p no lo fue. Las demás frecuencias genotípicas en otros polimorfismos (rs1800750 y rs2069705) no presentaron diferencias significativas en su distribución, al confrontar las de los casos de fiebre por dengue con los de fiebre por dengue.

### Asociación de combinaciones alélicas en dengue hemorrágico

Hubo nueve asociaciones significativas de combinaciones alélicas en el dengue hemorrágico (cuadro 5), cuatro de ellas en la combinación alélica No. 2 GGT, la cual tuvo mayor frecuencia en los casos de dengue hemorrágico que en los de fiebre por dengue (53 y 39 %, respectivamente), sin ajuste por el componente ancestral (OR=2,80; IC<sub>95%</sub> 1,26-6,24; p=0,012), e igualmente significativo con cualquier ajuste (africano, europeo o amerindio).

Un comportamiento similar se observó en la combinación alélica No. 4, GAC, vista con mayor frecuencia en los casos de dengue hemorrágico

que en los de fiebre por dengue (4 Vs. 3 %), el cual fue significativo sin ajuste (OR=11,09; IC<sub>95%</sub> 2,58-47,60; p=0,001) y con cualquier ajuste.

La frecuencia de la combinación alélica No. 5, AGC, fue elevada en los casos de dengue hemorrágico comparados con los de fiebre por dengue (4 % y 1 %, respectivamente), y fue significativa solo cuando se ajustó por el componente amerindio (OR=8,11;  $IC_{QSQL}$  1,09-60,49; p=0,042).

# Asociación de las variantes génicas en los endofenotipos relacionados con la gravedad del dengue

En el presente estudio, no hubo asociaciones significativas de los genotipos o alelos estudiados con los niveles séricos de las tres citocinas exploradas en la muestra completa. Las combinaciones alélicas evaluadas tampoco se asociaron con las diferencias en los niveles de IFN- $\gamma$ , ni con los niveles del TNF- $\alpha$  (no se muestran los datos).

Sin embargo, se encontraron cuatro asociaciones de combinaciones alélicas con los niveles de *IL-6* (cuadro 6). Concretamente, la combinación alélica

Cuadro 5. Asociación de combinaciones alélicas con dengue hemorrágico en la muestra completa ajustada por componente ancestral

No. <sup>a</sup> Ca <sup>b</sup>		Forma clínica			Sin ajuste	Ajustado por componente africano	Ajustado por componente europeo	Ajustado por componente amerindio	
				FD° (%)	DH⁴ (%)	OR <sup>e</sup> (IC <sub>95%</sub> ) <sup>f</sup> valor p <sup>g</sup>	OR <sup>e</sup> (IC <sub>95%</sub> ) <sup>f</sup> valor p <sup>g</sup>	OR <sup>e</sup> (IC <sub>95%</sub> ) <sup>f</sup> valor p <sup>g</sup>	OR <sup>e</sup> (IC <sub>95%</sub> ) <sup>f</sup> valor p <sup>g</sup>
1	G	G	С	47	24	1	1	1	1
2	G	G	Τ	39	53	2,80(1,26-6,24) 0,012h	2,67(1,20-5,94)0,017 <sup>h</sup>	2,55(1,15-5,66)0,022h	3,14(1,37-7,19)0,007 <sup>h</sup>
3	G	Α	Τ	5	3	1,02(0,13-8,33)0,98	1,21(0,13-11,52)0,87	1,08(0,12-10,04)0,95	1,14(0,14-9,05)0,90
4	G	Α	С	3	4	11,09(2,58-47,60)0,001 <sup>h</sup>	12,03(2,74-52,82)0,001 <sup>h</sup>	10,97(2,59-46,39)0,001 <sup>h</sup>	12,22(2,78-53,66)0,001 <sup>h</sup>
5	Α	G	С	1	4	7,05(0,99-50,29)0,053	4,72(0,68-32,62)0,12	4,83(0,69-33,56)0,11	8,11(1,09-60,49)0,042h

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> No.: número asignado a la combinación alélica; <sup>b</sup> Ca: combinación alélica conformada por los SNP rs1800750 - rs2069843 - rs2069705 en los genes *TNFA*, *IL6* e *IFNG*, respectivamente; <sup>c</sup> FD: fiebre por dengue; <sup>d</sup> DH: dengue hemorrágico; <sup>c</sup> OR: *Odds Ratio*; <sup>f</sup> IC<sub>95%</sub>: intervalo de confianza de 95 %; <sup>g</sup> Valor de p de la regresión logística; <sup>b</sup> Asociación significativa

Cuadro 6. Asociación de combinaciones alélicas con los niveles de interleucina-6 en la muestra completa ajustada por componente ancestral

No.a	Ca⁵	Proporción	Sin ajuste	Ajustado por componente africano	Ajustado por componente europeo	Ajustado por componente amerindio
			Media	Media	Media	Media
			Diferencia en pg/ml (IC <sub>95%</sub> )° valor de p <sup>d</sup>	Diferencia en pg/ml (IC <sub>95%</sub> )° valor de p <sup>d</sup>	Diferencia en pg/ml (IC <sub>95%</sub> )° valor de p <sup>d</sup>	Diferencia en pg/ml (IC <sub>95%</sub> ) <sup>c</sup> valor de p <sup>d</sup>
1	GGC	0,462	0,001	0,001	0,001	0,001
2	GGT	0,405	6,6(-4,49-17,68)0,24	7,12 (-3,92-18,15)0,21	6,69 (-4,48-17,86)0,24	6,03(-4,93-16,99)0,28
3	GAT	0,052	5,93 (-17,94-29,8)0,63	4,76 (-18,95-28,47)0,69	5,79 (-18,19-29,78)0,64	5.94(-17,6-29,.48)0,62
4 5	GAC AGC	0,045 0,017	-3,3 (-30,84-24,24)0,81 58,03 (7,47-109)0,025°	-3,17 (-30,56-24,23)0,82 63,78 (12,58-115)0,015°	-3,32(-30,93-24,28)0,81 58,53 (7,46-110)0,026°	-2,49(-29,7-24,72)0,86 61,01 (10,57-111)0,019°

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> No.: número asignado a cada combinación alélica; <sup>b</sup> Ca: combinación alélica conformada por los SNP rs1800750 - rs2069843 - rs2069705 en los genes *TNFA*, *IL6* e *IFNG*, respectivamente; <sup>c</sup> IC<sub>59%</sub>: intervalo de confianza al 95 %; <sup>d</sup> Valor de p de la regresión logística; <sup>e</sup> Asociación significativa

nombrada como No. 5 AGC, comparada con la No. 1 GGC, presentó diferencias significativas sin ajuste por componente genético ancestral en pg/ml (58,03 pg/ml Vs. 0,0001 pg/ml; p=0,025); asimismo, hubo diferencias significativas ajustando con cualquier componente genético ancestral (africano, europeo o amerindio).

Solo el genotipo "C/T" de la región del SNP 2069705 del *IFNG* se asoció con una mayor presencia de trombocitopenia comparada con su ausencia (47 % *Vs.* 20 %), cuando se ajustó por el componente africano (p=0,041), y también fue significativo cuando se ajustó por el amerindio (p=0,04), pero no así al ajustarlo por el europeo (no se muestran los datos).

Por último, no hubo relación entre las frecuencias de alelos, genotipos o combinaciones alélicas confrontadas con la infección secundaria (no se muestran los datos).

#### Discusión

Este estudio de epidemiología genética se realizó para evaluar la asociación de tres variantes en tres genes codificantes de citocinas con la gravedad del dengue. La hipótesis fue que los rs1800750, rs2069843 y rs2069705 de los genes *TNFA*, *IL6* e *IFNG*, respectivamente, estaban implicados en la presentación de las formas graves. Para probarla, se compararon los fenotipos del dengue relacionados con diferencias en las formas clínicas, como el dengue hemorrágico y la fiebre por dengue, y los endofenotipos, como los niveles séricos producidos por los genes estudiados, así como la presencia de trombocitopenia e infección secundaria, todo en una muestra de casos de una población colombiana.

Durante el período de estudio, se identificaron los serotipos DENV-1 a DENV-3, en concordancia con los serotipos que circularon entre los años 2008 y 2009 en el departamento de Antioquia (comunicación personal, Laboratorio Departamental de Salud Pública). El 2,2 % de los casos de dengue se confirmaron mediante RT-PCR con base en el total de la población estudiada (5/226), sin embargo, por esta técnica se diagnosticó 11,1 % (5/45). Otros autores han reportado la detección de ARN mediante RT-PCR en 48,4 % de los casos (38), diferencias que pueden explicarse por el tiempo de la toma de la muestra y la fecha de inicio de síntomas o con la prueba que se compara. En el presente estudio, la mayoría de los pacientes presentaban anticuerpos IgM en la fase aguda, es

decir, con más de cinco días de evolución de los síntomas, lo cual se relaciona con la disminución de la viremia y dificulta la detección del ARN viral.

Como se sabe que la composición genética individual puede influir en el riesgo de presentar formas graves del dengue (35), se puede considerar que una ventaja de este estudio fue haber controlado el análisis de asociación de polimorfismos génicos con información previa de los ancestros continentales, tal y como se ha recomendado para este tipo de estudios (39).

Como era de esperarse, los grupos poblacionales estudiados difirieron en las proporciones genéticas ancestrales y, así como Galanter (28) determinó las proporciones de mezcla ancestral en una muestra colombiana, también se encontró que los mestizos tenían mayor componente genético europeo mezclado con los componentes amerindio y africano (cuadro suplementario 4). Esta concordancia es un buen indicador de la confiabilidad de los datos analizados.

El análisis de variantes puso en evidencia el efecto génico puntual sobre el dengue hemorrágico. En primer lugar, el alelo "A" del rs2069843 del gen IL6 se relacionó con el dengue hemorrágico en afrocolombianos (cuadro 3), resultado curioso, pues se esperaba hallar variantes de resistencia en este grupo poblacional. No es la primera vez que se encuentran polimorfismos causales del incremento en la gravedad clínica en reacción a infecciones en poblaciones de ascendencia africana (40). La misma tendencia (incremento de A), también se observó en los pacientes mestizos, con la diferencia de no haber sido significativa, quizá porque se requeriría un mayor tamaño del grupo de dengue hemorrágico en este grupo poblacional (mestizos) para que el marcador genético alcance el mismo poder de discriminación, y también valida la autoidentificación africana como el estado de la variable con mayor influencia sobre las diferencias en la gravedad del dengue.

En segundo lugar, en la muestra completa los ajustes con la composición genética ancestral individual revelaron la relación entre el genotipo "G/A" del mismo rs2069843 con dengue hemorrágica, independientemente de los componentes ancestrales (cuadro 4). Este resultado sugiere el genotipo "G/A" como un biomarcador de la predisposición al dengue hemorrágico en Colombia, que no depende de los componentes genéticos ancestrales individuales ni la autoidentificación para determinar los grupos de riesgo.

El rs2069843 está en una región génica con alto grado de desequilibrio de ligamiento (41). En estudios recientes se ha demostrado el alto grado de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos sinténicos rs2069843 y rs2069845, cuyas variantes se heredan como haplotipos en el mismo gen (*IL6*) en poblaciones con un importante componente genético africano como la brasileña (42). Esta información sugiere que las variantes de importancia médica en este gen podrían ser heredadas en bloque, no solo en poblaciones con mayor ascendencia afroamericana, sino también en otras etnias de América en proceso de mezcla genética, como en el caso de Colombia (43).

En los artículos consultados, no se encontró evidencia de la relación directa entre el rs2069843 ubicado en el último intrón, su ligamiento con otros rs y sus efectos sobre la transcripción; por eso se propone que este polimorfismo, así como el rs2069845, podría estar relacionado con el denque hemorrágico en poblaciones en proceso de mezcla. Además, bajo el supuesto de estar ligados a otros rs ubicados en la región promotora, también lograrían predecir los niveles de transcripción, tal como lo sugieren los resultados de Fernández-Real (44) e, incluso, podría probarse su papel como biomarcador inflamatorio, pues de forma similar a lo encontrado en nuestro estudio, al controlar las diferencias por componente ancestral se descubrieron genotipos de riesgo frente al dengue hemorrágico (45).

Aquí, la combinación alélica "AGC" compuesta por los alelos de los rs1800750, rs2069843 y rs2069705 de los genes *TNFA*, *IL6* e *IFNG*, respectivamente, produjo 58,03 pg/ml de *IL-6* más que la combinación alélica "GGC", independientemente del componente ancestral (cuadro 6), lo cual respalda el efecto de las variantes directamente responsables de endofenotipos del dengue y su reacción diferencial. La mayor reacción de *IL-6* fue ajustada por el componente africano, lo cual es congruente con datos publicados previamente que registraron el más alto nivel de *IL-6* en *afrocolombianos* (46).

Estas asociaciones reiteradas en el cuadro 6 muestran un biomarcador deletéreo en los casos confirmados de dengue, independientemente del diagnóstico de fiebre por dengue o dengue hemorrágico y, también, del componente genético ancestral. Sin embargo, la mayor reacción observada al ajustar por el componente africano sugiere la existencia de otras variantes con origen en ese componente que no se consideraron en este estudio y que también tienen efecto.

El hecho de que el incremento en la frecuencia de la combinación alélica "AGC" en casos de dengue hemorrágico ajustados por el componente africano no fue significativo (cuadro 5), no impide ver su tendencia; además, el valor de la probabilidad sin ajuste por ancestro se mantuvo en el límite de la significación. Por lo tanto, no se descarta el efecto de dicha variante en la predicción de dengue hemorrágico, más aún considerando las relaciones de las variantes presentadas en los cuadros 5 y 6.

Como contrapartida, el incremento sustancial de la propensión al dengue hemorrágico encontrada en la combinación alélica "AGC" ajustada por el componente amerindio, conjuntamente con su tendencia cuando no se ajustó (cuadro 5), apuntan a un efecto sobre la forma clínica del dengue, no solo de las variantes aquí estudiadas, sino que también sugiere la existencia de otras variantes de riesgo con origen amerindio que se deben continuar buscando, como lo han sugerido Silva, et al. (47).

La importancia del estudio de estas combinaciones alélicas reside en que los polimorfismos no actúan independientemente de otros (20), y controlan en su conjunto la función génica al alterar los sitios de inicio de la transcripción (17) y, por ello, deben probarse a la luz de la expresión génica en otros ensayos funcionales en el futuro.

Desde el punto de vista de la fisiopatología, el incremento de *IL-6* en el dengue activa el endotelio, predisponiendo a la disfunción plaquetaria, e induce un activador de plasminógeno que lleva a la extravasación de plasma asociada al dengue hemorrágico (48), incrementa la expresión génica del fibrinógeno y el plasminógeno en hepatocitos y, como sucede en otras virosis como la fiebre amarilla, induce manifestaciones hemorrágicas (49). No es la primera vez que el rs2069843 se ha asociado a una enfermedad que podría implicar sangrado en población americana (50).

Por otra parte, los niveles del TNF-α pueden ser bajos cuando los de sus propios receptores son altos, lo que podría explicar por qué no se encontró asociación entre variantes del rs1800750 en la región promotora del *TNFA* y su producto génico, a pesar de que recientemente se reportó la determinación del rs1800750 sobre sus niveles séricos y la transcripción como reacción a un agente infeccioso (51).

Aunque el rs2069705 en el gen *IFNG* se ha asociado previamente con las diferencias en el IFN-γ como reacción a una infección viral (52), no se halló

evidencia de la asociación entre sus variantes y tales niveles, lo cual puede deberse a que la proteína NS1, como en el caso de otros flavivirus, puede haber inhibido la producción de IFN-γ, impidiendo una efectiva reacción antiviral (53).

Por último, se encontró la asociación entre el rs2069705 y la presencia de trombocitopenia. Dado que este polimorfismo ya había sido relacionado con la gravedad de otras enfermedades infecciosas (54,55), se cree que también tiene implicaciones en la malformación de megacariocitos y la diferenciación en plaquetas, predisponiendo a la trombocitopenia, como ocurre con otras fiebres hemorrágicas (56).

En conclusión, a pesar del tamaño tan pequeño de la muestra, en este trabajo hay indicios de que las variantes en los genes *TNFA*, *IL6* e *IFNG* hacen parte del componente genético que determina la variabilidad de la progresión del dengue.

La medición de las citocinas se hizo en un solo momento en cada individuo, cuando lo ideal es hacer un seguimiento de las evaluaciones en varios momentos, para disminuir la variación y tener una mejor aproximación a la producción de las citocinas.

#### **Agradecimientos**

Se agradece a las personas que participaron activamente de esta investigación en el Hospital General de Medellín, en el Hospital Venancio Díaz, la Clínica CES, el Hospital Pablo Tobón Uribe, Saludcoop, la Clínica Medellín, el Hospital Antonio Roldán Betancur, el Hospital Marco Fidel Suárez, el Hospital San Francisco de Asís y el Hospital Ismael Roldán, donde se captaron los participantes en el estudio.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

#### **Financiación**

Este trabajo fue financiado por Colciencias, proyectos: No. 325634319263 y No. 111549326145.

#### Referencias

- World Health Organization. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO; 2009. p. 3-17.
- Mangold KA, Reynolds SL. A review of dengue fever: A resurging tropical disease. Pediatr Emerg Care. 2013;29: 665-9. https://doi.org/10.1097/PEC.0b013e31828ed30e
- 3. Peña-García VH, Triana-Chávez O, Mejía-Jaramillo AM, Díaz FJ, Gómez-Palacio A, Arboleda-Sánchez S. Infection

- rates by dengue virus in mosquitoes and the influence of temperature may be related to different endemicity patterns in three Colombian cities. Int J Environ Res Public Health. 2016;13:734. https://doi.org/10.3390/ijerph13070734
- Normile D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. Science. 2013; 342:415. https://doi.org/10.1126/science.342.6157.415
- Rothman AL, Currier JR, Friberg HL, Mathew A. Analysis of cell-mediated immune responses in support of dengue vaccine development efforts. Vaccine. 2014;33:7083-90. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.104
- Balmaseda A, Hammond SN, Pérez L, Téllez Y, Saborio SI, Mercado JC, et al. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. Am J Trop Med Hyg. 2006;74:449-56.
- Murgue B, Roche C, Chungue E, Deparis X. Prospective study of the duration and magnitude of viraemia in children hospitalised during the 1996-1997 dengue-2 outbreak in French Polynesia. J Med Virol. 2000;60:432-8. https:// doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(200004)60:4<432::AID-JMV11>3.0.CO;2-7
- Halstead SB, Porterfield JS, O'Rourke EJ. Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera. Am J Trop Med Hyg. 1980;29:638-42.
- Alagarasu K, Damle I, Bachal R, Mulay A, Shah P, Dayaraj C. Association of promoter region polymorphisms of CD209 gene with clinical outcomes of dengue virus infection in Western India. Infect Genet Evol. 2013;17:239-42. https:// doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.024
- Restrepo BN, Ramírez RE, Arboleda M, Álvarez G, Ospina M, Díaz FJ. Serum levels of cytokines in two ethnic groups with dengue virus infection. Am J Trop Med Hyg. 2008;79:673-7.
- Malavige GN, Huang LC, Salimi M, Gomes L, Jayaratne SD, Ogg GS. Cellular and cytokine correlates of severe dengue infection. PLoS One. 2012;7:1-9. https://doi.org/10. 1371/journal.pone.0050387
- Castro JE, Vado-Solís I, Pérez-Osorio C, Fredeking TM. Modulation of cytokine and cytokine receptor/antagonist by treatment with doxycycline and tetracycline in patients with dengue fever. Clin Dev Immunol. 2011;2011:1-5. https://doi. org/10.1155/2011/370872
- 13. Gandini M, Reis SR, Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Freire Mda S, Galler R, et al. Dengue-2 and yellow fever 17DD viruses infect human dendritic cells, resulting in an induction of activation markers, cytokines and chemokines and secretion of different TNF-alpha and IFN-alpha profiles. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106:594-605. https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000500012
- 14. Perry ST, Buck MD, Lada SM, Schindler C, Shresta S. STAT2 mediates innate immunity to Dengue virus in the absence of STAT1 via the type I interferon receptor. PLoS Pathog. 2011;7:1-13. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001297
- Restrepo BN, Isaza DM, Salazar CL, Ramírez R, Ospina M, Álvarez LG. Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in infants with and without dengue. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41:6-10. https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000100002

- Lan NT, Hirayama K. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. Trop Med Health. 2011;39:73-81. http:// doi.org/10.2149/tmh.2011-S08
- 17. Sessions OM, Tan Y, Goh KC, Liu Y, Tan P, Rozen S, et al. Host cell transcriptome profile during wild-type and attenuated dengue virus infection. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:1-12. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002107
- Loeb M. Genetic susceptibility to west nile virus and dengue. Public Health Genomics. 2013;16:4-8. https://doi. org/10.1159/000345934
- Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. Nat Rev Genet. 2006;7:781-91. https:// doi.org/10.1038/nrg1916
- Harapan H, Jonny KF, Nur W, Jay RA, Lavanya N, Kurnia FJ. Non-HLA gene polymorphisms and their implications on dengue virus infection. Egyptian Journal of Medical Human Genetics. 2013;14:1-11. https://doi.org/10.1016/j. ejmhg.2012.08.003
- 21. Cansancao IF, Carmo AP, Leite RD, Rabenhorst SH. Asso-ciation of polymorphisms in IL1beta -511C>T, IL1RN 86 bp VNTR, and IL6 -174G>C Genes with clinical dengue signs and symptoms in Brazilian dengue patients. Viral Immunol. 2016;29:372-6. https://doi.org/10.1089/ vim.2015.0082
- Woo P, Humphries SE. IL-6 polymorphisms: A useful genetic tool for inflammation research? J Clin Invest. 2013; 123:1413-4. https://doi.org/10.1172/JCl67221
- Moreira LO, Zamboni DS. NOD1 and NOD2 signaling in infection and inflammation. Front Immunol. 2012;3:1-12. https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00328
- Fernández-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. Tissue Antigens. 2004;64:469-72. https://doi.org/10.1111/j. 1399-0039.2004.00304.x
- 25. He JR, Chen LJ, Su Y, Cen YL, Tang LY, Yu DD, et al. Joint effects of Epstein-Barr virus and polymorphisms in interleukin-10 and interferon-gamma on breast cancer risk. J Infect Dis. 2011;205:64-71. https://doi.org/10.1093/infdis/ jir710
- Pérez AB, Sierra B, García G, Aguirre E, Babel N, Álvarez M, et al. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, and interleukin-10 gene polymorphisms: Implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. Hum Immunol. 2010;71:1135-40. https:// doi.org/10.1016/j.humimm.2010.08.004
- 27. Galanter JM, Fernández-López JC, Gignoux CR, Barnholtz-Sloan J, Fernández-Rozadilla C, Via M, et al. Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture throughout the Americas. PLoS Genet. 2012;8:1-16. https://doi.org/10.1371/journal.pgen. 1002554
- World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever. Diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO; 1997. p. 12-23.
- BlacksellSD,JarmanRG,GibbonsRV,Tanganuchitcharnchai A, Mammen MP Jr., Nisalak A, et al. Comparison of seven commercial antigen and antibody enzyme-linked immunosorbent assays for detection of acute dengue infection. Clin Vaccine Immunol. 2012;19:804-10. https:// doi.org/10.1128/CVI.05717-11

- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992;30:545-51.
- Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. J Clin Microbiol. 1998;36:2634-9.
- Sambrook J, Russell DW. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. CSH Protoc. 2006; 2006:pii. https://doi.org/10.1101/pdb.prot4455
- Molokhia M, Hoggart C, Patrick AL, Shriver M, Parra E, Ye J, et al. Relation of risk of systemic lupus erythematosus to west African admixture in a Caribbean population. Hum Genet. 2003;112:310-8. https://doi.org/10.1007/s00439-002-0883-3
- 34. Shriver MD, Parra EJ, Dios S, Bonilla C, Norton H, Jovel C, et al. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. Hum Genet. 2003;112:387-99. https://doi.org/10.1007/s00439-002-0896-y
- 35. Chacón-Duque JC, Adhikari K, Avendaño E, Campo O, Ramírez R, Rojas W, et al. African genetic ancestry is associated with a protective effect on dengue severity in colombian populations. Infect Genet Evol. 2014;27:89-95. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.003
- McKeigue PM, Carpenter JR, Parra EJ, Shriver MD. Estimation of admixture and detection of linkage in admixed populations by a Bayesian approach: Application to African-American populations. Ann Hum Genet. 2000;64:171-86. https://doi.org/10.1017/S0003480000008022
- 37. **Zhivotovsky LA.** Relationships between Wright's F ST and F IS statistics in a context of Wahlund effect. J Hered. 2015;106:306-9. https://doi.org/10.1093/jhered/esv019
- Chua KB, Mustafa B, Abdul AH, Chem YK, Khairul AH, Kumarasamy V, et al. A comparative evaluation of dengue diagnostic tests based on single-acute serum samples for laboratory confirmation of acute dengue. Malays J Pathol. 2011;33:13-20.
- Blanton RE, Silva LK, Morato VG, Parrado AR, Dias JP, Melo PR, et al. Genetic ancestry and income are associated with dengue hemorrhagic fever in a highly admixed population. Eur J Hum Genet. 2008;16:762-5. https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.4
- Clark TG, Diakite M, Auburn S, Campino S, Fry AE, Green A, et al. Tumor necrosis factor and lymphotoxinalpha polymorphisms and severe malaria in African populations. J Infect Dis. 2009;199:569-75. https://doi.org/10. 1086/596320
- 41. Ng DP, Nurbaya S, Ye SH, Krolewski AS. An IL-6 haplotype on human chromosome 7p21 confers risk for impaired renal function in type 2 diabetic patients. Kidney Int. 2008;74:521-7. https://doi.org/10.1038/ki.2008.202
- 42. Farhat SB, de Souza CM, Braosi AP, Kim SH, Tramontina VA, Papalexiou V, et al. Complete physical mapping of IL6 reveals a new marker associated with chronic periodontitis. J Periodontal Res. 2016. https://doi.org/10.1111/jre.12389
- 43. Qi L, van Dam RM, Meigs JB, Manson JE, Hunter D, Hu FB. Genetic variation in IL6 gene and type 2 diabetes: Tagging-SNP haplotype analysis in large-scale case-control study and meta-analysis. Hum Mol Genet. 2006;15:1914-20. https://doi.org/10.1093/hmg/ddl113

- 44. Fernández-Real JM, Broch M, Vendrell J, Richart C, Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. J Clin Endocrinol Metab. 2000; 85:1334-9. https://doi.org/10.1210/jcem.85.3.6555
- 45. Stahl EA, Wegmann D, Trynka G, Gutiérrez-Achury J, Do R, Voight BF, et al. Bayesian inference analyses of the polygenic architecture of rheumatoid arthritis. Nat Genet. 2012;44:483-9. https://doi.org/10.1038/ng.2232
- 46. Restrepo BN, Ramírez R, Agudelo-Flórez PM, Avendaño-Tamayo E, Chacón-Duque JC, Rojas W, et al. Características clínicas y niveles de citocinas en pacientes con dengue y su relación con la raza. Rev Biomed. 2010;21:137-47.
- 47. Silva LK, Blanton RE, Parrado AR, Melo PS, Morato VG, Reis EA, et al. Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. Eur J Hum Genet. 2010;18:1221-7. https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.98
- 48. Rachman A, Rinaldi I. Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6. Acta Med Indones. 2006;38:105-8.
- 49. Woodson SE, Freiberg AN, Holbrook MR. Coagulation factors, fibrinogen and plasminogen activator inhibitor-1, are differentially regulated by yellow fever virus infection of hepatocytes. Virus Res. 2013;175:155-9. https://doi.org/10. 1016/j.virusres.2013.04.013
- Rausch SM, Clark MM, Patten C, Liu H, Felten S, Li Y, et al. Relationship between cytokine gene single nucleotide

- polymorphisms and symptom burden and quality of life in lung cancer survivors. Cancer. 2010;116:4103-13. https://doi.org/10.1002/cncr.25255
- 51. Sinha S, Mishra SK, Sharma S, Patibandla PK, Mallick PK, Sharma SK, et al. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcgammaRIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population. Malar J. 2008;7:1-11. https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-13
- 52. He JR, Chen LJ, Su Y, Cen YL, Tang LY, Yu DD, et al. Joint effects of Epstein-Barr virus and polymorphisms in interleukin-10 and interferon-gamma on breast cancer risk. J Infect Dis. 2012;205:64-71. https://doi.org/10.1093/infdis/ iir710
- Ye J, Zhu B, Fu ZF, Chen H, Cao S. Immune evasion strategies of flaviviruses. Vaccine. 2013;31:461-71. https:// doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.015
- 54. Kim K, Cho SK, Sestak A, Namjou B, Kang C, Bae SC. Interferon-gamma gene polymorphisms associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 2010;69:1247-50. https://doi.org/10.1136/ard. 2009.117572
- 55. Wang D, Zhong X, Huang D, Chen R, Bai G, Li Q, et al. Functional polymorphisms of interferon-gamma affect pneumonia-induced sepsis. PLoS One. 2014;9:1-8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087049

Cuadro suplementario 1. Protocolo para el diagnóstico del serotipo infeccioso y cebadores para amplificar las regiones en los genes candidatos evaluados

#### Protocolo de amplificación de los serotipos DENV-1 a DENV-4

140 µl de suero para extraer el ARN viral empleando un estuche comercial (QIAamp Viral RNA kit de Qiagen). Eluído con 60 µl de solución tampón, el ARN se almacenó a -80 °C hasta su uso. La RT-PCR se realizó en una sola reacción. La mezcla fue la siguiente: 10 µl ARN molde y cinco cebadores (D1 y TS1 a 0,5 µM, los cebadores TS2, TS3 y DEN4 a 0,25 µM). Además, 0,5 U de la RT (marca AMVRT promega), 0,625 U de la enzima ADN polimerasa (marca GoTaq Hot Start), 3,5 µl de solución tampón 5X (Green GoTaq flexibuffer), 2,6 mM de MgCL2 (marca Promega), los desoxinucleótidos trifosfato (DNTP) en una concentración de 150 µM en un total de 35 µl de volumen. La reacción de transcripción inversa se hizo a 42 °C por 60 minutos, seguidos de un ciclo inicial de desnaturalización de la RT y activación de la ADN polimerasa a 95 °C por 5 minutos; luego 40 ciclos a 95 °C por 15 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 minuto y 72 °C por 5 minutos de extensión. La amplificación se hizo en un termociclador de marca Bio-Rad C1000. Después de la amplificación, un producto de 10 µl fue resuelto por electroforesis en agarosa al 2 % en solución TBE 1x con un marcador de peso molecular de 50 pb (GeneRuler, Fermentas), con el fin de determinar el serotipo infeccioso por diferencias en el tamaño de la banda de amplificación (DENV-1 482pb, DENV-2 119pb, DENV-3 290pb y DENV-4 389pb).

Iniciadores utilizados para amplificar las regiones de los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en los genes candidatos evaluados

TNFA: directo 5'-CCAGGCTTGTCCCTGCTAC-3' y reverso 5'-CCGGATCATGCTTTCAGTG-3'; IL6: directo 5'-TCCTGCCTCTGCCATTTCT-3' e inverso 5'-TCACCATCCCTTTAGGATCTG-3'); IFNG: directo 5'-TCAAGCCAGTTTTACAGGTAAGG-3' e inverso 5'-GAGAATGGCTTGAACCCAGA-3'.

Cuadro suplementario 2. Diferencias en las frecuencias delta en cada uno de los 19 marcadores de componente genético ancestral usados para este estudio

Marcador	Africano (AF)	Europeo (EU)	Amerindio (AM)	d <sup>a</sup> AF-EU	d <sup>a</sup> AF-AM	d <sup>a</sup> EU-AM
FY-NULL	0,001	0,998	1,000	0,997	0,999	0,002
AT3	0,858	0,282	0,061	0,576	0,797	0,221
MID1752	0,560	0,290	0,920	0,270	0,360	0,630
GCF	0,853	0,156	0,339	0,697	0,514	0,183
GCS	0,931	0,393	0,458	0,538	0,473	0,065
MID1386	0,770	0,730	0,070	0,040	0,700	0,660
MID817	0,960	0,650	0,130	0,310	0,830	0,520
MID1039	0,980	0,270	0,830	0,710	0,150	0,560
MID944	0,890	0,390	0,950	0,500	0,060	0,560
MID856	0,660	0,150	0,690	0,510	0,030	0,540
MID1358	0,800	0,060	0,040	0,740	0,760	0,020
MID104	0,560	0,350	0,110	0,210	0,450	0,240
MID1066	0,840	0,280	0,260	0,560	0,580	0,020
DRD2	0,135	0,670	0,045	0,535	0,090	0,625
APOA1	0,420	0,925	0,977	0,505	0,557	0,052
PV92	0,225	0,152	0,792	0,073	0,567	0,640
MID818	0,090	0,780	0,980	0,690	0,890	0,200
Sb19.3	0,415	0,903	0,645	0,488	0,230	0,258
MID154	0,820	0,250	0,140	0,570	0,680	0,110

La frecuencia pertenece al alelo de mayor tamaño (alelo 1), equivalente a la inserción en las inserciones-deleciones, y a la ausencia de sitio de corte en los RFLP. <sup>a</sup> d: diferencia delta entre las frecuencias alélicas. Estas frecuencias se tomaron de las respectivas poblaciones ancestrales reportadas para estos polimorfismos en el *National Center for Biotechnology Information*: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Cuadro suplementario 3. Descripción detallada de los 19 marcadores de componente genético ancestral usados en el presente estudio

Marcador	Posición	SNPa	Insb	Ta <sup>c</sup> (pb)	Enzima	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')
FY-NULL	1q23.2	T/C		172, (152/20)	Rsal	AGGCTTGTGCAGGCAGTG	GGCATAGGGATAAGGGACT
AT3	1q25.1	I/D	68	572, 504	N/A <sup>d</sup>	CCACAGGTGTAACATTGTGT	GAGATAGTGTGATCTGAGGC
MID1752	1p32.3	I/D	35	139, 104	N/A <sup>d</sup>	TGTTTGTACCTTCCAAGTCTCT	AGATTGACATTCCTTCCACA
GCF	4q13.13	T/G		200, (121/79)	Haelll	AGATCTGAAATGGCTATTATTTTGC	GAGGTGAGTTTATGGAACAGC
GCS	4q13.13	G/T		200, (128,72)	Styl	AGATCTGAAATGGCTATTATTTTGC	GAGGTGAGTTTATGGAACAGC
MID1386	4q21.3	I/D	6	109, 103	N/A <sup>d</sup>	GTTATGTGGGCAGTGTTTTC	CCACAGAAGGCTCAGTCTTA
MID817	5p15.2	I/D	23	140, 117	N/A <sup>d</sup>	ATTACCGGAACACATTCTGA	CCTACATCCAACAGAAGGTG
MID1039	5p13.13	I/D	40	128, 88	N/A <sup>d</sup>	CGTTTCATCTCTTTGGGTTA	GCTTTCTTCATTCCTTCACA
MID944	5q14.3	I/D	30	140, 110	N/A <sup>d</sup>	TCAGTAAAAGGGTTTCCTTGT	GTAAGCAGCCTGGATTACAA
MID856	5q12.13	I/D	26	112, 138	N/A <sup>d</sup>	AACATGGGAACTGCTCATTA	TATTGTGCTCATTTTCTGGG
MID1358	5p13.2	I/D	17	125, 108	N/A <sup>d</sup>	GTTTTGGGAATTTAGGTTTTG	AGACGCCAGGAATTTTCTAT
MID104	6p21.32	I/D	5	126, 121	N/A <sup>d</sup>	CAGAGGGTCTAGAGCAAAATT	CCTTAGCTCAGTATGCTCCA
MID1066	7p15.1	I/D	19	103, 84	N/A <sup>d</sup>	TCTTGGGACTCAGAGTTCAG	CAGAAACCAAGGTGAAAGTG
DRD2	11q23.3	C/T		300 (211/89)	Taq1	CCGTCGACCCTTCCTGAGTGTCATCA	CCGTCGACGGCTGGCCAAGTTGTCTA
APOA1	11q24.2	I/D (Alu)	301	409, 108	N/A <sup>d</sup>	AAGTGCTGTAGGCCATTTAGATTAG	AGTCTTCGATGACAGCGTATACAGA
PV92	16q24.3	I/D (Alu)	300	716, 416	N/A <sup>d</sup>	AACTGGGAAAATTTGAAGAGAAAGT	TGAGTTCTCAACTCCTGTGTGTTAG
MID818	16p13.13	Ì/D	24	143, 119	N/A <sup>d</sup>	TAGAGCCAGTTAGAGGGAGG	ACTTCAGTCGTCACTCCATC
Sb19.3	19p11	I/D (Alu)	311	767, 456	N/A <sup>d</sup>	TCTAGCCCCAGATTTATGGTAACTG	AAGCACAATTGGTTATTTTCTGAC
MID154	20q11.22	Ì/D	26	147, 121	$N/A^d$	GGCTCTGACTGAGAAACTGA	AACAGGCAATCCTCCTAAGT

a SNP: polimorfismo de nucleótido simple; b Ins: tamaño de la inserción en pb; c Ta: tamaño del alelo en pares de bases (pb); c N/A: no aplica

**Cuadro suplementario 4.** Proporciones de los componentes africano, europeo y amerindio calculadas para las dos poblaciones y la muestra completa a partir de los AIM

Autoidentificación	Componente ancestral / media ± DE; mediana, 25:75											
	Europeo	Amerindio	Africano									
Afro-colombiano, n=122	0,150±0,125; 0,10, 0,07: 0,16ª	0,098±0,121; 0,13, 0,10: 0,18 <sup>a</sup>	0,75±0,184 0,76, 0,64: 0,8ª									
Mestizos, n=104	0,652±0,100; 0,52, 0,48: 0,56°	0,193±0,075; 0,39, 0,35: 0,46 <sup>a</sup>	0,155+/-0,081; 0,06, 0,04: 0,08°									
Muestra completo, n=226	0,382±0,275	0,142±0,113	0,476±0,332									

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Recurso: Galanter, *et al.* (28). Los componentes genéticos ancestrales están dados en media ± desviación estándar (DE); mediana y percentiles 25:75 (24).

Cuadro suplementario 5. Frecuencias alélicas y equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra completa y ajustada por autoidentificación

Gen	SNPa	MAF⁵	Muestra	Autoidentifica	nción	Población ancestral (NCBI)						
			completa <sup>-</sup>	Afrocolombiano	Mestizo	Europea <sup>d</sup>	Amerindia <sup>d</sup>	Africana <sup>d</sup>				
TNFA	rs1800750	Α	0,0381°	0,0333	0,0437	0,009	0,050	0,004				
IL6	rs2069843	Α	0,0942	0,1134	0,0721	0,013	0,080	0,146				
IFNG	rs2069705	Т	0,4797	0,4667	0,4951	0,624	0,410	0,536				

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> SNP: polimorfismo de nucleótido simple; <sup>b</sup> MAF: alelo de menor frecuencia (MAF) reportado en la base de datos internacional del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/; <sup>c</sup>Esta variante para esta población se encontró por fuera del equilibrio debido a exceso de heterocigotos; <sup>d</sup> Frecuencias alélicas en las poblaciones con origen europeo, amerindio o africano reportadas en el NCBI.

#### ARTÍCULO ORIGINAL

# Valoración mediante espirometría de mineros del carbón de Paipa, Colombia

Nubia González<sup>1</sup>, Sara Lucía Díaz<sup>2</sup>, Myriam Rocío Wilches<sup>2</sup>, Mabel Patricia Franky<sup>2</sup>, César Méndez<sup>1,3</sup>, Andrea del Rosario Herrera<sup>2</sup>

- <sup>1</sup> Grupo de Investigación HYGEA, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia
- <sup>2</sup> Grupo de Investigación OXIGENAR, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia
- <sup>3</sup> Servicio de Medicina Interna, Hospital Regional de Duitama, Duitama, Colombia

**Introducción:** Las enfermedades respiratorias derivadas de la exposición a material en partículas, como sucede en la minería del carbón, continúa siendo un reto investigativo en el país y un problema de salud pública. La espirometría es una prueba de la función respiratoria, fundamental para el diagnóstico y la vigilancia de este tipo de enfermedades pulmonares crónicas.

**Objetivo.** Determinar los valores de la espirometría en la población minera de carbón del municipio de Paipa, y su asociación con la edad y el tiempo de exposición laboral.

**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio descriptivo de corte transversal. Se diligenció el cuestionario de enfermedad respiratoria ocupacional de la *American Thoracic Society* (ATS), se registraron las mediciones de la espirometría y se interpretaron siguiendo las recomendaciones internacionales.

**Resultados.** La muestra incluyó 226 trabajadores de minas de carbón de Paipa; en 12,3 % (n=28) de ellos se registraron alteraciones leves, de tipo obstructivo o restrictivo. En 35 % (n=80) hubo disminución de la relación entre la capacidad vital forzada y el volumen espirado en el primer segundo (CVF/VEF<sub>1</sub>). Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el rango de edad (p=0,002) y los años de trabajo minero (p=0,34), además de trastornos restrictivos y obstructivos. Asimismo, hubo una asociación estadísticamente significativa entre el rango de edad (p<0,01) y los años de trabajo minero (p<0,01), de diferente seriedad en el patrón de las mediciones de la espirometría.

**Conclusiones.** La espirometría es una prueba útil para detectar la presencia de trastornos respiratorios en la población minera del carbón. La enfermedad respiratoria en estos mineros estuvo significativamente asociada con el tiempo de exposición.

Palabras clave: espirometría; minería; carbón; ocupaciones; material particulado; exposición a riesgos ambientales.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3364

#### Spirometry in a population of coal miners in Paipa, Colombia

**Introduction:** Respiratory diseases resulting from exposure to particulate matter such as in coal mining remains a research challenge in this country and a public health issue. Spirometry is a basic test of fundamental respiratory function for the diagnosis and monitoring of these types of chronic lung diseases.

**Objective:** To determine spirometric values in the coal mining municipality of Paipa and their association with age and occupational exposure times.

**Materials and methods:** We conducted a descriptive cross-sectional study. The occupational respiratory disease questionnaire of the American Thoracic Society (ATS) was completed while spirometric measurements were performed and interpreted in accordance with international recommendations for conducting the test.

**Results:** The sample consisted of 226 coal mining workers of the municipality of Paipa. Twenty-eight subjects (12.3%) of the sample showed patterns of obstructive and restrictive respiratory disease with mild degrees of severity. Eighty subjects (35%) showed a decrease in the forced vital capacity ratio/expiratory volume in one second (FVC/FEV<sub>1</sub>). A statistically significant association between age

#### Contribución de los autores:

Nubia González, Myriam Rocío Wilches y Mabel Patricia Franky: estructuración del proyecto, análisis, recolección de datos y escritura del manuscrito

Sara Lucía Díaz: trabajo de campo y escritura del manuscrito

César Méndez: análisis y validación de los datos de la espirometría y escritura del manuscrito

Andrea del Rosario Herrera: trabajo de campo

range (p=0.002) and years of mining work (p=0.34) with the development of restrictive and obstructive disorders was found. Also, there was a statistically significant association between age range (p<0.01) and years of mining work (p<0.01) with various degrees of severity of the spirometric pattern. **Conclusions:** Spirometry is a useful test for detecting the presence of respiratory disorders in the population of coal miners. The time of exposure was significantly associated with the respiratory disease exhibited by these miners.

**Key words:** Spirometry; mining; coal; occupations; particulate matter; environmental exposure. doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3364

El carbón es el combustible fósil más abundante en la naturaleza, y su producción mundial asciende a 860.938 millones de toneladas al año. La producción de este mineral ubica a Colombia en el décimo primer lugar, con 6.593,4 millones de toneladas, equivalentes al 0,8 % de la producción mundial, lo cual lo convierte en el país con mayores reservas de carbón en América Latina (1).

La explotación de carbón representa una actividad importante debido a la gran demanda energética de países como China, India, Japón, Estados Unidos y Sudáfrica. Su extracción y consumo se asocian con el crecimiento económico, pero también, con la contaminación del medio ambiente (2).

La minería del carbón se considera como la más contaminante en todas las etapas de su proceso productivo y se asocia con problemas de salud en las comunidades, de integridad ecológica y en el clima global (3-5). Además, la actividad minera artesanal ha sido desatendida por los gobiernos en términos de salud ocupacional, condiciones de explotación, marginalidad económica y social, tecnología precaria e inestabilidad laboral.

Estos obstáculos impiden que se den las condiciones laborales y ambientales que garanticen la protección integral de la salud de los trabajadores (6). Entre las principales partículas que se transmiten por el aire en la explotación minera, está el sílice cristalino libre, que es el compuesto más abundante en la superficie terrestre y, por consiguiente, el polvo más común en el aire al que están expuestos los mineros. El sílice produce silicosis, una neumoconiosis típica que se desarrolla internamente tras muchos años de exposición. Además del sílice, o del silicio, otras partículas microscópicas suspendidas en el aire a

Correspondencia:

Nubia González, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Boyacá, Carrera 2 este N° 64-169, Campus Universitario,

Tunja, Colombia

Teléfono: 745 0022, extensión 1104 nubiagonzalez@uniboyaca.edu.co

Recibido: 28/05/16; aceptado: 14/12/16

las que está expuesta la población minera, son las de amianto y el polvo de carbón, cuya inhalación puede causar el mesotelioma y la asbestosis (otro tipo de neumoconiosis) (7). En algunos estudios, se ha evidenciado la movilización de elementos como el flúor, con grandes repercusiones en la salud (8-12).

La neumoconiosis es la enfermedad más estudiada en los mineros de carbón. Está asociada con la exposición al material en partículas (13), específicamente proveniente del hierro y del sílice del mineral (14,15). A pesar de todos los esfuerzos dedicados a su prevención, la neumoconiosis continúa presentándose en los países industrializados y en desarrollo. Se sabe que la evolución de la neumoconiosis es insidiosa y progresiva; en sus etapas iniciales evoluciona de manera asintomática y, en la mayoría de los casos, se diagnostica cuando las complicaciones y secuelas pulmonares se encuentran en un estado avanzado en los trabajadores. El diagnóstico tardío imposibilita la atención médica oportuna para disminuir el daño pulmonar pues, como casi todas las enfermedades pulmonares ocupacionales, es irreversible y no hay un tratamiento específico (16).

El número de trabajadores expuestos a polvo de sílice en Colombia se ha estimado en 405.855, lo que corresponde a 6,1 % del total de los trabajadores afiliados al Sistema General de Riesgos Profesionales (17). En 37,7 % de los centros de trabajo del departamento de Boyacá, se ha determinado que el material en partículas es un factor de riesgo respiratorio (18). A pesar de estas cifras, el estudio de los posibles impactos de la minería del carbón en la salud son incipientes y hay muy pocas referencias de la gran prevalencia de síntomas respiratorios y alteración de la función respiratoria, relacionada con la explotación del carbón (19-26).

La American Thoracic Society y el American College of Chest Physicians han recomendado que la espirometría sea parte de la evaluación de rutina de los pacientes con enfermedades respiratorias y de aquellos con riesgo de desarrollarlas.

La espirometría es un estudio simple, sin riesgo y reproducible, que permite efectuar la mejor evaluación funcional cuantitativa de las características mecánicas de la respiración, y hacer el seguimiento del paciente y de los tratamientos instituidos (27). La espirometría se considera una valiosa prueba de detección general de la salud respiratoria y de exploración de la función pulmonar (28), por lo que debería considerarse fundamental para la detección precoz, el diagnóstico, la valoración de la seriedad y el seguimiento de las enfermedades respiratorias crónicas, especialmente de aquellas que cursan con obstrucción del flujo aéreo (29,30).

En este contexto, el presente estudio tuvo como propósito determinar los valores de la espirometría y su asociación con la edad y el tiempo de exposición laboral de una población de mineros del carbón del municipio de Paipa, de manera que se establezca una línea de base que sirva para orientar la implementación de estrategias que mitiguen el riesgo respiratorio.

#### Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio descriptivo de corte transversal entre el 2014 y el 2016 en el marco de un proyecto mayor de investigación de la población minera de carbón de Paipa, Colombia.

De la población total de trabajadores que cumplían con los criterios de inclusión, se tomó una muestra utilizando el programa Epidat<sup>®</sup>, con una precisión del 5 %, una confiabilidad del 95 % y una prevalencia esperada de alteración funcional respiratoria del 26,1 %. El muestreo de la población de estudio se hizo de forma no probabilística, por conveniencia.

Se incluyeron mineros de carbón de las veredas Salitre 1 y 2, Volcán, Cruz de Murcia y Jazminal, del municipio de Paipa, que desempeñaran cualquiera de las actividades de la mina (malacatero, cochero, piquero, administrador, trabajador en superficie o bajo tierra). Se excluyeron de la muestra los mineros con una vinculación laboral minera inferior a cinco años y los menores de edad.

Se consideraron como variables de interés aspectos sociodemográficos como la edad, el sexo, los años de trabajo en la minería y el terreno de trabajo (bajo tierra o superficie). Para evaluar los antecedentes tóxicos y alérgicos y la sintomatología respiratoria (exposición a humo de leña y cigarrillo, disnea, tos), se usó el cuestionario de enfermedad respiratoria ocupacional de la *American Thoracic Society*, ATS (31).

#### Evaluación por espirometría

Se evaluó el patrón de la espirometría (obstructivo, restrictivo o mixto), la seriedad de la enfermedad y los valores específicos de la espirometría: la capacidad vital forzada (CVF), el volumen espirado forzado en el primer segundo (VEF<sub>1</sub>), la relación entre el volumen espirado forzado en el primer segundo y la capacidad vital forzada (VEF<sub>1</sub>/CVF), el flujo espiratorio forzado<sub>25-75</sub> y el flujo espiratorio pico (PEF).

La prueba (datos demográficos del paciente, datos ambientales, análisis de gráficas, calibración con jeringa de tres litros), se hizo según las recomendaciones internacionales de la Asociación Latinoamericana del Tórax (ALAT) (32-34). Para su interpretación, se tomaron los valores de referencia del *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) III y la graduación A de calidad de la prueba.

Se utilizó un espirómetro Vitalograph ALPHA Touch Modelo 6000® (Vitalograph), calibrado con jeringa de tres litros. Para evaluar el principio de detección de flujo, se utilizó un neumotacógrafo de Fleisch. La contrapresión de referencia fue menor de 0,1 kPa/L/s a 14 L/s, que cumple con las normas de la *American Thoracic Society* y la *European Respiratory Society* (ERS) de 2005.

La detección del volumen se hizo por integración de flujo, con muestreo a 100 Hz. La exactitud del volumen fue de  $\pm 3$ % o 0,05 L,con volumen máximo de 9,99 L, y volumen mínimo de 0,01 L. La linealidad aceptada fue mayor de  $\pm 3$ %. La exactitud en las condiciones del rango de temperatura de operación fue de  $\pm 10$ % o 0,3 L/s de flujo, con un flujo máximo de  $\pm 16$  L/s y un flujo mínimo de  $\pm 0,02$  L/s.

#### Procesamiento y análisis de datos

Los datos recolectados se almacenaron, se tabularon y se sistematizaron con el paquete estadístico SPSS™, versión 20.0 (Chicago, IL). La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk se utilizó para analizar la distribución de los datos en cada variable. Se evaluaron las medias para las variables continuas y las proporciones para las categóricas o nominales, con sus correspondientes intervalos de confianza (IC). La prueba de ji al cuadrado se utilizó para determinar la significación estadística de las posibles asociaciones resultantes del análisis bivariado. Además, se establecieron relaciones de variables numéricas mediante la aplicación de pruebas paramétricas (Pearson). Se aceptó la significación estadística con un valor de p<0,05.

#### Consideraciones éticas

El proyecto marco fue avalado formalmente por el Comité de Bioética de la Universidad de Boyacá (CB 121 del 29 de enero de 2015), a partir de lo establecido en la Resolución 008430 de 1993 emitida por el Ministerio de Salud, y se categorizó como una investigación de mínimo riesgo. Además, se contó con la aceptación y la firma del consentimiento informado.

#### Resultados

#### Aspectos sociodemográficos

Los 226 mineros seleccionados del total de 980, eran todos de sexo masculino. En cuanto al terreno de trabajo, 92 % (IC $_{95\%}$  88-95) de los participantes trabajaba bajo la superficie. El promedio de edad fue de 36 años (DE=±0,31; IC $_{95\%}$  35-38), y 17,7 % (n=226) de los sujetos de estudio estaba entre los 31 y los 40 años de edad. El promedio de tiempo de trabajo que reportó el grupo de mineros fue de 16 años (DE=±10,52; IC $_{95\%}$  15-17), y 40 % de ellos llevaba trabajando entre 5 y 10 años. El 76 % (IC $_{95\%}$  70-81) de la muestra tenía antecedentes de exposición al humo de leña y 62 % (IC $_{95\%}$  55-68), al humo de cigarrillo. Con respecto a la presencia de síntomas respiratorios, 20 % (IC $_{95\%}$  14-25) presentaba tos y 15 %, disnea (IC $_{95\%}$  10-19).

#### Patrones de la espirometría y gravedad

En 13,2 % (n=30) de los participantes, se registraron alteraciones de tipo obstructivo (12,3 %; n=28) o restrictivo (1 %; n=2). El 9,8 % de los mineros presentó una anormalidad leve en la espirometría, fuera obstructiva (8,8 %) o restrictiva (1 %); otros, en porcentajes menores, se clasificaron como de seriedad moderada o como una variante fisiológica (cuadro 1).

#### Parámetros específicos de la espirometría

En el 35 % de la población, se registró una disminución de la relación entre la capacidad vital forzada y el volumen espirado en el primer segundo (VEF<sub>1</sub>), lo cual concuerda con la presencia de trastorno obstructivo entre los participantes. En 32 % de ellos, se registró alteración del flujo espiratorio forzado<sub>75</sub> (FEF: 75%), lo cual es indicativo de una grave alteración fisiológica de las vías aéreas.

### Relación entre el patrón general de la espirometría y el rango de edad

Se observó una asociación estadísticamente significativa (p=0,002) entre la edad y el desarrollo de trastornos restrictivos u obstructivos. El mayor porcentaje de mineros con un patrón restrictivo estaba en el grupo de edad de los 18 a los 25 años, en tanto que los mineros con patrón obstructivo eran mayores de 45 años (cuadro 2).

### Relación entre el patrón de la espirometría y los años de trabajo minero

Se presentó una asociación estadísticamente significativa (p=0,34) entre los años de trabajo y el desarrollo de trastornos pulmonares (cuadro 3).

### Asociación entre la gravedad de los patrones de la espirometría y el rango de edad

Se demostró una asociación estadísticamente significativa (p<0,01) entre gravedad del patrón de la espirometría y el rango de edad, registrándose la mayor gravedad a partir de los 41 a 45 años de edad (cuadro 4).

#### Asociación entre la gravedad de los patrones de la espirometría y los años de trabajo minero

Hubo una asociación estadísticamente significativa (p<0,01) entre seriedad del patrón de la espirometría y los años dedicados a la minería, registrándose la mayor proporción de casos graves a partir de los 26 a 30 años de trabajo minero (cuadro 1).

#### Discusión

El estudio demostró que la espirometría fue una herramienta útil para evaluar la presencia de enfermedad pulmonar en un grupo de mineros de una población dedicada a la explotación de carbón. Se evidenció que predominó la alteración obstructiva y que el trastorno de tipo restrictivo tuvo menor frecuencia; la anormalidad en la espirometría, fuera obstructiva o restrictiva, fue leve en la mayoría de los casos; en la espirometría, los patrones de CVF/VEF<sub>1</sub> y de FEF<sub>75</sub> registraron disminución en sus valores. La edad y los años de trabajo minero se asociaron con la presencia de trastornos en la espirometría y su gravedad.

Los parámetros de las pruebas de función pulmonar presentaron una gran variabilidad entre los individuos, ya que dependen de las características antropométricas de los pacientes, como se ha documentado previamente (34).

El sexo de los sujetos de la muestra de estudio refleja que la actividad laboral en las minas de carbón está a cargo de los hombres, fundamentalmente, lo cual coincide con los datos reportados en los estudios de González, et al. (20), Garrote, et al. (25), Ospina, et al. (24), y Jiménez, et al. (26), en los cuales la mayoría de los trabajadores, cuando no todos, también eran del sexo masculino. En general, son

Cuadro 1. Asociación entre la gravedad de los patrones de la espirometría y los años de trabajo minero

Grado de								Aŕ	ios c	le trab	ajo	miner	0								р
gravedad y patrón de la	5	a 10	11	a 15	16 a 20		21	a 25	26	a 30	31	a 35	36 a 40		41 a 45		46	a 50	Total		-
espirometría	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	-
Variante fisiológica	2	40,0	1	20,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	20,0	1	20,0	0	0,0	0	0,0	5	100	
Leve	6	27,3	3	13,6	2	9,1	4	18,2	2	9,1	3	13,6	1	4,5	0	0,0	1	4,5	22	100	0,000*
Moderado	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	33,3	1	33,3	0	0,0	1	33,3	0	0,0	3	100	
Normal	82	41,8	44	22,4	29	14,8	13	6,6	9	4,6	8	4,1	9	4,6	2	1,0	0	0,0	196	100	
Total	90		48		31		17		12		13		11		3		1		226		

<sup>\*</sup> Significación estadística, con p  $\leq$  0,05

Cuadro 2. Patrón de la espirometría y rangos de edad

Patrón general de la espirometría								Ra	ango	s de e	dad (	(años)									р
	18	a 25	26 a 30		31 a 35		36	a 40	41	41 a 45		46 a 50		51 a 55		a 60	60	a 65	Total		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Obstructivo	3	10,7	2	7,1	1	3,6	4	14,3	8	28,6	2	7,1	3	10,7	3	10,7	2	7,1	28	100	
Restrictivo	1	50,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	50,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	100	0,002*
Normal		17,9		15,8	39	19,9		- ,		12,8		, -	17	8,7	3	1,5	1	5	196	100	
Total	39	17,3	33	14,6	40	17,7	40	17,7	33	14,6	12	5,3	20	8,8	6	2,7	3	1,3	226	100	

<sup>\*</sup> Significación estadística con p≤0,05

Cuadro 3. Patrón de la espirometría y años de trabajo minero

Patrón general de la espirometría								Αñ	os d	e traba	jo m	inero									р
	5 a 10		11 a 15		16 a 20		21	a 25	26	26 a 30		31 a 35		36 a 40		a 45	46	a 50	Total		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Obstructivo	6	21,4	4	14,3	2	7,1	4	14,3	3	10,7	5	17,9	2	7,1	1	3,6	1	3,6	28	100	
Restrictivo	2	100	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	100	0,034
Normal	82	41,8	44	22,4	29	14,8	13	6,6	9	4,6	8	4,1	9	4,6	2	1,0	0	0,0	196	100	
Total	90	39,8	48	21,2	31	13,7	17	7,5	12	5,3	13	5,8	11	4,9	3	1,3	1	4	226	100	

<sup>\*</sup> Significación estadística con p≤0,05

Cuadro 4. Grado de seriedad de los patrones de la espirometría y rangos de edad

Grado de								Ran	gos d	de eda	d (a	ños)									р
seriedad y patrón de la	10	a 25	26	a 30	31 a 35		36 a 40		41	41 a 45		46 a 50		51 a 55		a 60	60	) a 65	Total		-
espirometría	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	-
n	0	0,0	1	20,0	0	0,0	2	40,0	0	0,0	1	20,0	1	20,0	0	0,0	0	0,0	5	100	
Leve	4	18,2	1	4,5	1	4,5	2	9,1	8	36,4	1	4,5	1	4,5	3	13,6	1	4,5	22	100	0,000*
Moderado	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	33,3	1	33,3	0	0,0	1	33,3	3	100	
Normal	35	17,9	31	15,8	39	19,9	36	18,4	25	12,8	9	4,6	17	8,7	3	1,5	1	5	196	100	
Total	39		33		40		40		33		12		20		6		3		226		

<sup>\*</sup> Significación estadística con p≤0,05

escasos los estudios que mencionan la presencia de mujeres entre la población minera, por lo cual no se las incluye en las poblaciones de estudio. Al examinar la participación diferenciada por sexo en este sector, las cifras de empleo en Colombia correspondientes al periodo de 2001 a 2006 y publicadas por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), establecen que, en el 2001, las mujeres representaban el 18,6 % de la fuerza de trabajo ocupada en el sector minero, mientras que, en el 2006, representaban el 19,8 %, pasando de 17.000 a 43.000 trabajadoras en esta rama de la industria. Por el contrario, los hombres pasaron de 74.000 a 174.000 ocupados en este sector durante el mismo período, es decir, pasaron de representar el 81,4 % al 80 % del total.

Se encontró en el estudio que 92 % de los mineros de carbón desarrollaba su actividad bajo la superficie, lo cual coincide con lo hallado en otros estudios en los que se han encontrado porcentajes de 68,8 % (20), 69,5 % (26), 72,4 % (24) y 85,3 % (25). Ello implica que esta población esté expuesta no, solo al material en partículas, sino a gases contaminantes, ya que en la mayoría de estas minas la extracción del carbón se hace con técnicas rudimentarias.

El promedio de edad de la muestra estudiada (36 años) es similar a lo reportado en los estudios de González, et al., y de Ospina, et al. (20,24), en los cuales la edad promedio fue de 30 años, así como en los de Jiménez, et al. (26), con una edad promedio de 31,5 años, y en los de González, et al. (20), y de Abril, et al. (36), en los cuales la edad promedio fue de 37 años.

En este estudio, la edad mínima fue de 18 años, sin embargo, esta cifra no representa la realidad de la población, ya que aquí se incluyeron solo mineros mayores de edad. De todas maneras, se encontró que en la población estudiada las personas de 18 años llevaban en promedio de dos a tres años trabajando en las minas, lo que demuestra que iniciaron su actividad minera antes de cumplir la mayoría de edad permitida para laborar. En los estudios mencionados, la edad fue menor, entre los 15 y los 17 años. A pesar de que en el presente estudio la edad máxima fue de 65 años, algunos estudios revisados reportaron mineros de carbón mayores de 65 años (21).

En cuanto a los años de trabajo en el sector minero, la muestra del estudio reportó una media de 16 años, con un mínimo de 5 y un máximo de 45 años. Estos datos son similares a lo reportado por Jiménez, et al. (26), en cuyo estudio el tiempo de trabajo en las minas fluctuó entre menos de un año y 46 años. Esto demuestra que la exposición a riesgos físicos y químicos es inherente a esta actividad laboral y que el riesgo de desarrollar

problemas pulmonares es mayor, lo cual justifica la necesidad de vigilar la salud de los trabajadores mineros (24).

En cuanto a los antecedentes tóxicos y alérgicos, el 76 % de la población minera estudiada tenía antecedentes de exposición al humo de leña y, el 62 %, al humo de cigarrillo. Estos hallazgos son similares a lo encontrado por González, et al. (20), quienes confirmaron el uso de leña y carbón para la preparación de la comida en los hogares de este grupo de trabajadores.

En cuanto a la sintomatología respiratoria de la población minera estudiada, la tos se presentó en el 20 % y la disnea en el 15 %, una proporción menor que la reportada en el estudio de González, et al. (20), quienes registraron que el 42,7 % de los encuestados experimentaban tos crónica y que los síntomas respiratorios se presentaban con mayor frecuencia en quienes trabajaban bajo la superficie y en profundidad, como los piqueros y cocheros. Asimismo, según los datos reportados por Garrote, et al. (25), el 90 % de la población del estudio tenía algún síntoma respiratorio (disnea, tos, expectoración o sibilancias, morbilidad respiratoria), lo cual contrasta con los datos reportados en este estudio. La disnea en la muestra estudiada, se presentó en un porcentaje similar al reportado anteriormente en la población minera de este municipio, donde el síntoma se valoró con tres escalas de percepción de fatiga y registró grados bajos y medios (21). Este dato probablemente esté asociado con el inicio de la enfermedad respiratoria crónica, cuando aún no hay compromiso de la relación entre la ventilación y la perfusión, o esta no es sugestiva de enfermedad respiratoria en progreso.

Con respecto a la saturación arterial de oxígeno de la población minera estudiada, solo disminuyó en el 11 %, resultado similar a lo reportado en el estudio de González, et al. (20), en el que el 3,9 % del total de la población de estudio presentó una saturación arterial de oxígeno inferior al 90 %.

En cuanto a los hallazgos de la espirometría, el estudio reveló que el13,2% (n=30) de la muestra presentaba alteraciones de tipo obstructivo o restrictivo, dato que contrasta con los resultados de González, et al., en el 2009, en esta misma población (20), quienes reportaron un patrón anormal en la espirometría en el 26,1 % de la muestra, así como con las cifras informadas por Garrote, et al. (25) en el 2013, del 97,6 % de los sujetos con alteración en la espirometría.

Con respecto al tipo de patrón anormal de la espirometría, en este estudio se registraron 12,3 % (n=28) de patrones de obstrucción y 1 % (n=2) de patrones de restricción. Estos porcentajes difieren significativamente de los patrones registrados en el estudio de González, et al. (20), de 21,5 % con el obstructivo, 72,9 % con el restrictivo y 5,6 % con el mixto, y el de Garrote, et al. (25), de 2,4 % (n=4) con el obstructivo y de 7,8 % (n=13) con el restrictivo. Estas diferencias se pueden atribuir a los criterios de inclusión y exclusión establecidos en cada estudio, al igual que al tamaño de la muestra y al tipo de muestreo utilizado.

En el 9,8 % de los participantes, la seriedad de las alteraciones obstructivas o restrictivas en la espirometría fue de grado leve. Este porcentaje difiere del reportado por González, et al., quienes registraron grados entre moderados y muy graves en 33,6 % de la muestra. Esta diferencia se debe, probablemente, a un tiempo de exposición más prolongado y a rangos de edad más avanzada en este último estudio (20).

Al analizar cada uno de los parámetros de la espirometría, se pudo observar que, en términos generales, estuvieron dentro de los límites de normalidad para este tipo de mineros. Estos resultados constituyen un aporte significativo a la caracterización de estas poblaciones, que no habían tenido una valoración respiratoria detallada, por lo menos en nuestro medio. A diferencia del estudio de González, et al. (20), en el 2009 en esta misma población, el valor agregado del presente estudio radica en que se detallaron parámetros de la espirometría como la CVF, el VEF<sub>1</sub>, la relación CVF/VEF<sub>1</sub>, el FEF<sub>25-75</sub> y el FEP. Los datos de este estudio demostraron una disminución de la relación CVF/VEF, en el 35 % de la población, dato que es coherente con la frecuencia de los patrones obstructivos en la espirometría, en la cual este parámetro funcional es un marcador importante para la tipificación de este tipo de alteración (33). Asimismo, las disminuciones en el FEF<sub>25-75</sub> indican que se ha producido una alteración fisiológica de las vías aéreas de gran calibre, aspecto que ratifica, una vez más, los patrones obstructivos registrados.

En otros estudios a nivel internacional en poblaciones mineras para evaluar la función pulmonar a partir de pruebas de espirometría, como el de Wang, et al.(37), en una población de 6.373 mineros de minas subterráneas de carbón de algunos condados de Estados Unidos, se han reportado anormalidades en la espirometría en el 13,1%

(n=836) de ellos: 6,4 % con patrón restrictivo, 5,4 % con patrón obstructivo y 1,3 % con patrón mixto. A pesar de la diferencia de contextos y de las muestras, los hallazgos muestran similitudes con los de este estudio en los porcentajes totales de las alteraciones. Asimismo, es patente una diferencia en los patrones de anormalidades en la espirometría, que, en este estudio, fueron más frecuentes para la obstrucción que para la restricción, en tanto que no se encontraron patrones mixtos.

Altekruse, et al. (38), reportaron porcentajes de valores de la CVF/VEF<sub>1</sub> significativamente inferiores con el aumento de los años de trabajo en trabajadores con caolinosis, datos que de alguna forma guardan similitud con los hallazgos de este estudio, en el que se reportó una disminución de la relación CVF/VEF<sub>1</sub> en el 35 % de los participantes evaluados. Además, hubo una asociación estadística significativa (p=0,34) entre los años de trabajo minero, un tiempo de exposición de 5 a 10 años y el desarrollo de trastornos restrictivos u obstructivos, lo cual se tradujo en una disminución de los parámetros funcionales mencionados.

En un grupo de mineros de un distrito de Nottinghamshire con edades entre 40 y 70 años (39), valorado con pruebas de función pulmonar, se observó un déficit medio en el VEF<sub>1</sub> cuantificado en un litro o más con respecto a los valores de FEV<sub>1</sub> predichos, lo cual reafirma la constancia en la disminución de este parámetro de la función pulmonar y de la relación entre CVF y VEF<sub>1</sub>, como se constató en este estudio y en otros más en el contexto internacional (40-42).

La asociación estadísticamente significativa (p=0,34) reportada en el estudio entre los años de trabajo minero (tiempo de exposición) y la aparición de la alteración en la espirometría, reafirma la relación lineal estadísticamente significativa que se ha reportado también en los estudios de Naidoo, et al. (43), y de López, et al. (44).

Una de las fortalezas de este estudio es la contribución de nuevos datos sobre la función pulmonar en la población minera del carbón, lo cual permitirá cuantificar de forma objetiva los daños ocasionados por esta actividad laboral para que la exposición al material en partículas se dimensione como un problema de salud pública en el contexto local, regional y nacional, en aras del establecimiento de políticas específicas.

Las limitaciones del estudio están relacionadas con el tipo de muestreo, pues no permite generalizar los resultados con precisión estadística para esta población (sesgo de confusión en la fase de diseño). También, hubo un sesgo de medición y no se contempló el control de las variables de confusión o distractoras; sin embargo, el estudio abre la puerta a futuras investigaciones que contemplen el control de este tipo de sesgos y variables de confusión, con lo cual se podrán hacer extrapolaciones internas y externas de los resultados.

Los resultados del trabajo brindan datos de base muy importantes para implementar un programa integral de rehabilitación pulmonar en la población afectada.

#### Agradecimientos

A la Cooperativa Agrominera de Paipa, AGROMIN, y a la población minera participante en el estudio.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

#### **Financiación**

Como parte del proyecto marco sobre la "Asociación de actividad minera y pruebas funcionales respiratorias en población trabajadora de minas de carbón de Paipa, Boyacá, Colombia, 2014-2016", el presente estudio fue patrocinado por la Universidad de Boyacá, por Colciencias (contrato de joven investigador – innovador 645 de 2014), y por Gestión Energética S.A. E.S.P., GENSA S.A. E.S.P y NONIN Medical INC.

#### Referencias

- Ministerio de Minas y Energía. Cadena del carbón. Bogotá: Unidad de Planeación Minero-Energética; 2012. p. 80. Fecha de consulta: 23 de octubre de 2015. Disponible en: www.upme.gov.co/Docs/Cadena\_Carbon\_2012.pdf.
- George KV, Patil DD, Alappat BJ. PM10: PM10 in the ambient air of Chandrapur coal mine and its comparison with other environments. Environ Monit Assess. 2013;185:1117-28. https://doi.org/10.1007/s10661-012-2619-8
- Verbel JO, Gallardo KC, Castilla AG. Implicaciones de la minería del carbón en el ambiente y la salud humana: una aproximación abreviada al estado del arte. En: Contraloría General de la República. Minería en Colombia: institucionalidad y territorio, paradojas y conflictos. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia; 2013. p. 229.
- Keating M. Cradle to grave: The environmental impacts from coal. Boston: Clean Air Task Force; 2001. p. 1-9.
- Mamurekli D. Environmental impacts of coal mining and coal utilization in the UK. Acta Montanistica Slovaca Rocnik. 2010;15:134-44.
- Alcaldía de Paipa, Cooperativa Agrominera Multiactiva de Paipa. Estudio de condiciones de trabajo y salud del sector minero de Paipa. Paipa: Coagromin; 2001.

- Weeks JL. Peligros para la salud en la minería y las canteras: minas y canteras. En: Organización Internacional del Trabajo, editor. Enciclopedia de la OIT. Madrid: D-INSHT; 2012.
- Luo K, Renb D, Xua L, Daib S, Caob D, Fenga F, et al. Fluorine content and distribution pattern in Chinese coals. Int J Coal Geol. 2004;57:143-9. https://doi.org/10.1016/j.coal.2003.10.003
- Wu D, Zheng B, Tang X, Li S, Wang B, Wang M. Fluorine in Chinese coals. Fluoride. 2004;37:125-32.
- Guijian L, Liugen Z, Duzgoren-Aydin N, Lianfen G, Juunhhua L, Zicheng P. Health effects of arsenic, fluorine, and selenium from indoor burning of Chinese coal. Rev Environ Contam Toxicol. 2007;189:89-106.
- 11. **World Health Organization.** Environment health criteria. Geneva: World Health Organization; 2007.
- Marshall E. The fluoride debate: One more time. Science. 1990;247:276-7. https://doi.org/10.1126/science.2296717
- Karkhanis VS, Joshi JM. Pneumoconioses. Indian J Chest Dis Allied Sci. 2013;55:25-34.
- 14. Attfield MD, Petsonk EL, Wagner GR. Enfermedades pulmonares en los mineros de carbón. En: Organización Internacional del Trabajo. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. Ginebra: OIT; 2012.
- McCunney RJ, Morfeld P, Muranko H. Carbon black. Environ Health Perspect. 2011;119:A332-3. https://doi. org/10.1289/ehp.1103444
- McCunney RJ, Morfeld P, Payne S. What component of coal causes coal workers' pneumoconiosis? J Occup Environ Med. 2009;51:462-71. https://doi.org/10.1097/JOM. 0b013e3181a01ada
- Ministerio de la Protección Social. Plan nacional para la prevención de la silicosis, la neumoconiosis de los mineros de carbón y la asbestosis, 2010-2030. Bogotá: Ministerio de la Protección Social; 2011.
- Ministerio de la Protección Social. Primera encuesta nacional de condiciones de salud y trabajo en el sistema general de riesgos profesionales. Bogotá: Ministerio de la Protección Social; 2007.
- 19. León-Mejía G, Espitia-Pérez L, Hoyos-Giraldo LS, Da Silva J, Hartmann A, Henriques JA, et al. Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay. Sci Total Environ. 2011;409:686-91. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.10.049
- 20. González NM, Abril FG, Díaz JM, Cubaque MA, Villamil EH. Utilidad de las técnicas de espirometría y oximetría en la predicción de alteración pulmonar en trabajadores de la minería del carbón en Paipa, Boyacá. Rev Fac Med (Bogotá). 2009;57:100-10.
- 21. González NM, Mateus EG, Rojas MP, Niño CA. Evaluación de la disnea en un grupo de mineros del carbón de municipio de Paipa, Boyacá. Ciencia y Salud. 2013;2:21-6.
- 22. González NM, Fernández LF, Riveros EP. Caminata de seis minutos en un grupo de mineros de carbón del municipio de Paipa, Boyacá, 2010-2011. Rev Colomb Neumol. 2011; 23:34-9.

- Ospina JM, González NM, Fernández LJ. Evidencia temprana de alteración funcional por exposición respiratoria: minería artesanal del carbón en Paipa, Colombia. Rev Fac Nac Salud Pública. 2011;29:445-53.
- Ospina JM, Manrique FG, Guío JA. Salud y trabajo: minería artesanal del carbón en Paipa, Colombia. Avances en Enfermería. 2010;28:107-15.
- 25. Garrote CF, Malagón JN, Morgan G, Combariza D, Varona M. Caracterización de las condiciones de salud respiratoria de los trabajadores expuestos a polvo de carbón en minería subterránea en Boyacá, 2013. Revista UIS Salud. 2014;46:237-47.
- Jiménez CP, Zabala IT, Idrovo ÁJ. Condiciones de trabajo y morbilidad entre mineros del carbón en Guachetá, Cundinamarca: la mirada de los legos. Biomédica. 2015;35: 77-89. https://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i0.2439
- Szeinuk J. Espirometría simple en adultos sanos no fumadores a nivel de Bogotá. Acta Méd Colom. 1988;13:452-6.
- Torre-Bouscoulet L, Pérez-Padilla R. Ajuste de varias ecuaciones de referencia espirométrica a una muestra poblacional en México. Salud Pública Méx. 2006;48:466-73.
- American Thoracic Society, European Respiratory Society. Standardization of spirometry. Eur Respir J. 2005;26:319-38.
- Represas-Represas C, Botana-Rial M, Leiro-Fernández V, González-Silva AI, García-Martínez A, Fernández-Villar A. Short- and long-term effectiveness of a supervised training program in spirometry use for primary care professionals. Arch Bronconeumol. 2013;49:378-82. https://dx.doi.org/10.1016/j.arbres.2013.01.001
- 31. American Thoracic Society. Recommended respiratory disease questionnaires for use with adults and children in epidemiological research. Fecha de consulta: 23 de octubre de 2015. Disponible en: https://www.thoracic.org/members/assemblies/assemblies/srn/questionaires/sgrq.php
- 32. Pérez R, Valdivia G, Muiño A, López MV, Márquez MN, Montes de Oca M, et al. Spirometric reference values in 5 large Latin American cities for subjects aged 40 years or over. Arch Bronconeumol. 2006;42:317-25.
- Vásquez JC, Pérez R. Interpretación de la espirometría en 10 pasos. Guía de bolsillo. México: Asociación Latinoamericana de Tórax, ALAT; 2012. p. 1-48.
- 34. García-Río F, Calle M, Burgos F, Casan P, Del Campo F, Galdiz JB, et al. Normativa sobre la espirometría. Barcelona: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica, SEPAR; 2013. p. 66.

- 35. Bermúdez RE, Rodríguez T, Roa T. Mujer y minería: ámbitos de análisis e impactos de la minería en la vida de las mujeres, enfoque de derechos y perspectiva de género. Fecha de consulta: 27 de enero de 2016. Disponible en: https://desterresminees.pasc.ca/wp-content/uploads/2015/11/Bermudez-Rico-et-al-2011-Mujer\_y\_Mineria.pdf
- Abril J, González M. Condiciones de salud y trabajo en la mina de carbón El Samán, Municipio de Sardinata (Norte de Santander) (tesis). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2009. p. 89.
- Wang ML, Beeckman-Wagner LA, Wolfe AL, Syamlal G, Petsonk EL. Lung-function impairment among US underground coal miners, 2005 to 2009: Geographic patterns and association with coal workers' pneumoconiosis. J Occup Environ Med. 2013;55:846-50. https://dx.doi.org/10.1097/ JOM.0b013e31828dc985
- 38. Altekruse EB, Chaudhary BA, Pearson MG, Morgan WK. Kaolin dust concentrations and pneumoconiosis at a kaolin mine. Thorax. 1984;39:436-41.
- Lewis S, Bennett J, Richards K, Britton J. A cross sectional study of the independent effect of occupation on lung function in British coal miners. Occup Environ Med. 1996:53:125-8.
- Soutar CA, Hurley JF. Relation between dust exposure and lung function in miners and ex-miners. Br J Ind Med. 1986;43:307-20.
- Blackley DJ, Laney AS, Halldin CN, Cohen RA. Profusion of opacities in simple coal workers' pneumoconiosis is associated with reduced lung function. Chest. 2015;148: 1293-9. https://doi.org/10.1378/chest.15-0118
- 42. Wang M, Wu Z, Du Q, Petsonk E, Peng K, Li Y, et al. A prospective cohort study among new Chinese coal miners: The early pattern of lung function change. Occup Environ Med. 2005:62:800-5. https://doi.org/10.1136/oem. 2005.020271
- 43. Naidoo RN, Robins TG, Solomon A, White N, Franzblau A. Radiographic outcomes among South African coal miners. Int Arch Occup Environ Health. 2004;77:471-81. https://doi.org/10.1007/s00420-004-0532-3
- 44. López-Rojas F, Nava-Larraguivel R, Salinas-Tovar S, Santos-Celis R, Marín-Cotoñieto RA, Méndez-Vargas MM. Neumoconiosis en trabajadores expuestos a polvos inorgánicos. Rev Med IMSS. 2008;46:163-70.

#### ARTÍCULO ORIGINAL

# Estimación del subregistro de casos de enfermedad por el virus del chikungunya en Girardot, Colombia, noviembre de 2014 a mayo de 2015

Óscar Pacheco<sup>1</sup>, Máncel Martínez<sup>2</sup>, Ángela Alarcón<sup>3</sup>, Mauricio Bonilla<sup>4</sup>, Alexandra Caycedo<sup>5</sup>, Tania Valbuena<sup>6</sup>, Angie Zabaleta<sup>4</sup>

- Subdirección de Prevención, Vigilancia y Control en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
- <sup>2</sup> Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
- <sup>3</sup> Subdirección de Análisis del Riesgo y Respuesta Inmediata, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
- <sup>4</sup> Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
- <sup>5</sup> Subdirección de Análisis, Caprecom, Bogotá, D.C., Colombia
- <sup>6</sup> Dirección de Sanidad del Ejército, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** En Colombia, la enfermedad causada por el virus del chikungunya se constituyó en una epidemia en el 2015. Se estima que hubo un subregistro del número de casos notificados al sistema de vigilancia, lo cual resulta en sesgos en las proyecciones epidemiológicas que sirven para la adopción de decisiones, un grave problema que no permite apreciar la magnitud y la importancia epidemiológica real de la enfermedad.

**Objetivo.** Estimar el subregistro de los casos de chikungunya en el municipio de Girardot, Cundinamarca, entre noviembre de 2014 y mayo de 2015.

**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio descriptivo y retrospectivo mediante encuestas en las viviendas de las 132 manzanas seleccionadas por muestreo aleatorio simple en la búsqueda activa comunitaria, y en el 100 % de los registros individuales de prestación de servicios y del Sivigila mediante búsqueda activa institucional. Los datos se analizaron en el programa Epilnfo, versión 7.

**Resultados.** La tasa de ataque estimada fue de 64,7 %. El subregistro de casos se estimó en 36,1 % por no haber asistido a consulta y, en 24,9 %, por falta de notificación. Según las respuestas de los encuestados, la causa más frecuente para no haber consultado fue la automedicación (n=392; 43 %), seguida del colapso en la prestación de los servicios de salud (207; 23 %).

**Conclusión.** El subregistro general fue del 87,05 %, desde el inicio de la epidemia en Girardot; en este estudio se explica el 60,9 % de este subregistro.

Palabras clave: Aedes aegypti; virus del chikungunya; vigilancia epidemiológica; registro de enfermedades; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3370

## Estimation of underreporting of Chikungunya virus infection cases in Girardot, Colombia, from November, 2014, to May, 2015

**Introduction:** Chikungunya virus infection in Colombia became epidemic in 2015. It is estimated that there is underreporting of cases to the public health surveillance system which can induce bias in epidemiological projections for decision making, a serious problem, as it veils the real magnitude and actual epidemiological importance of this disease.

**Objective:** To estimate the underreporting of cases of chikungunya infection in the municipality of Girardot, Cundinamarca, from November, 2014, to May, 2015.

**Materials and methods:** We conducted a descriptive and retrospective study using surveys in 132 blocks selected by simple random sampling for community active search and the revision of 100% of the individual records of health services and those from the public health surveillance system for institutional active search. The data were analyzed using Epilnfo, version 7.

**Results:** The attack rate was 64.7%. The estimated underreporting was 36.1% for not attending medical consultation while 24.9% of cases were not reported to the public health surveillance system. The principal cause for not seeking medical consultation among those surveyed (n=392; 43%) was self-medication, followed by the collapse of health services (n=207; 23%).

#### Contribución de los autores:

Todos los autores participaron en el diseño del protocolo, la revisión del instrumento, la recolección de información, la revisión y la redacción del artículo.

**Conclusion:** The overall underreporting since the beginning of the epidemic in Girardot was 87.05%. This research explains 60.9% of this underreporting.

**Key words:** Aedes aegypti; Chikungunya virus; epidemiological surveillance; diseases registries; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3370

El virus del chikungunya es un arbovirus del género *Alphavirus*, cuyo vector y reservorio es el mosquito del género *Aedes*, especies *aegypti* y *albopictus*, cuyas poblaciones se encuentran por debajo de los 2.200 msnm (1).

La enfermedad presenta tres fases: la primera es la aguda, con un periodo de hasta diez días, caracterizada por fiebre, poliartralgia y erupción cutánea (en 3 % a 28 % de la población la enfermedad puede cursar sin síntomas) (2); la segunda es la subaguda, que se desarrolla en 20 a 40 % de los casos y puede durar hasta tres meses, considerada como una reactivación de la enfermedad (3), y la tercera es la crónica, la cual se presenta con la exacerbación de los dolores articulares y la rigidez, siendo las personas de la tercera edad v aquellos con trastornos articulares subyacentes (reumáticos y traumáticos) los más proclives a desarrollarla; esta fase puede persistir en cerca de 33 % de los pacientes durante cuatro meses, en 15 % durante 20 meses, y en 12 % entre 3 y 5 años (4,5). La mortalidad es rara y ocurre principalmente en los adultos mayores (6).

Se cree que en las Américas los primeros casos de chikungunya se dieron en las islas menores del Caribe, como la de San Martín, en diciembre de 2013; de ahí la infección se diseminó a las islas mayores, inicialmente en el mes de julio en la República Dominicana, donde se presentó el mayor número de casos (cerca de 400.000 personas afectadas). La enfermedad alcanzó las costas de Venezuela, desde donde se introdujo a Colombia a principios del mes de agosto del 2014 y, posteriormente, a otros países de Centroamérica. Hasta mediados de septiembre del 2014, se habían reportado más de 730.000 casos sospechosos en 21 países y otras zonas de las Américas (7).

Correspondencia:

Óscar Eduardo Pacheco, Subdirección de Prevención, Vigilancia y Control en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: (571) 220 7700, extensión 1375

opacheco@ins.gov.co

Recibido: 20/05/16; aceptado: 20/01/17

El principal reto de los equipos de salud es apoyar el adecuado manejo clínico del paciente a partir del diagnóstico del síndrome febril. Se deben tener en cuenta las posibles causas de la fiebre en la población, con base en la información epidemiológica del territorio, para determinar de qué infección se trata, especialmente en el caso del chikungunya, del dengue o de una combinación de las dos enfermedades.

En el 2014, se notificaron 106.592 casos al Sistema de Información de Vigilancia Nacional (Sivigila) y, hasta la semana epidemiológica 20 del 2015, 247.599. Con respecto a las muertes, hasta la semana epidemiológica 22 del 2015, se confirmaron 35 muertes por chikungunya en el país, para una letalidad de 0,0094 % (8).

El departamento de Cundinamarca aportó el 16,2 % de los casos autóctonos confirmados por clínica y laboratorio en la Región Central de Colombia, y Girardot, uno de los municipios más grandes del departamento, registró la mayor notificación durante el periodo de estudio, con 8.788 casos (8).

A pesar de las estrategias de notificación, se estima que hubo un subregistro del número de casos notificados, lo cual genera sesgos en las proyecciones epidemiológicas y, en consecuencia, afecta la adopción de decisiones sobre el manejo de la epidemia. Esto constituye un grave problema, pues no permite apreciar la importancia epidemiológica real de esta enfermedad, y dificulta la adopción de decisiones oportunas y adecuadas en torno a las intervenciones en salud individual y colectiva.

El subregistro afecta los servicios de salud e influye en el incremento de las incapacidades, la inasistencia escolar, el tiempo con síntomas como el dolor articular, especialmente entre los adultos mayores, lo que conlleva una inversión adicional de recursos en las familias, así como aumento del número de permisos o ausencias laborales entre la población económicamente activa (9).

Son diversas las razones por las cuales no se notificaron todos los casos de la enfermedad al sistema de vigilancia. La primera es que solo se notifican los casos de las personas que consultan a los servicios de salud, y la segunda, que algunos casos detectados no se notificaron al sistema de vigilancia por errores de procedimiento, o por desconocimiento del diagnóstico (9).

En la República Dominicana, uno de los primeros países que enfrentó la enfermedad en las Américas y recopiló las lecciones aprendidas en los primeros seis meses, se documentó que el subregistro durante la epidemia fue importante según algunas encuestas rápidas realizadas en el momento (10). En el país no se hallaron estudios que evaluaran la magnitud del subregistro de los casos de chikungunya.

En este contexto, los objetivos de este trabajo fueron: estimar el subregistro general de los casos de chikungunya en el municipio de Girardot entre noviembre del 2014 y mayo del 2015; describir las características sociales y demográficas de las personas afectadas; estimar el subregistro de casos de personas con chikungunya que no consultaron a los servicios médicos y describir las causas de dicha inasistencia, y estimar el subregistro de los casos no notificados de personas que sí asistieron a consulta en las instituciones prestadoras de servicios de salud.

#### Materiales y métodos

#### Tipo de estudio y población

Se hizo un estudio descriptivo y retrospectivo cuya duración correspondió a la fase epidémica de la fiebre por chikungunya en Girardot, entre noviembre del 2014 y mayo del 2015. La población estaba constituida por los habitantes del área urbana del municipio de Girardot.

#### Muestra

Para la búsqueda activa comunitaria, se hizo un muestreo aleatorio simple; el marco muestral estuvo conformado por 1.143 manzanas; la estimación de la probabilidad poblacional fue del 9 %, con un nivel de confianza del 95 % y un error muestral esperado del 5 %. El número de manzanas para la muestra fue de 114, con 20 % adicional para dar cuenta de la ausencia de respuesta; la georreferenciación de las manzanas seleccionadas en la muestra se hizo con el módulo Epi-Map de Epi Info7. Se visitaron todas las viviendas en cada una de las manzanas y se entrevistó a las personas que aceptaron participar voluntariamente.

Para la búsqueda activa institucional, se utilizaron todos los registros individuales de prestación de servicios (RIPS) entregados por la Secretaría de Salud de Girardot y los de la base de datos del Sivigila con los códigos de notificación individual y colectiva de casos de chikungunya.

Para verificar la calidad de la información de las historias clínicas, se hizo un muestreo aleatorio simple de un marco muestral conformado por 4.415 RIPS de las cuatro instituciones prestadoras de servicios de salud, seleccionadas de los casos cuyo diagnóstico principal era fiebre no especificada y aquellos que cumplían con la definición de caso de chikungunya.

Se calculó el tamaño de la muestra de historias clínicas para una probabilidad poblacional del 9 %, un intervalo de confianza de 95 % y un error muestral esperado de 5 %. El número de historias clínicas revisado fue de 122 y se añadieron 49 historias clínicas. El tamaño de las muestras se calculó en Epi-Info 7.

#### Variables y nivel de medición

Las variables nominales incluyeron el sexo, el régimen de afiliación al sistema de seguridad social, la fecha de inicio de síntomas, la consulta a centros de salud, las causas de la falta de consulta, y la autopercepción de la presencia de la enfermedad. Entre las variables de razón, se incluyeron la edad, el número de casos reportados al Sivigila, el número de registros en los RIPS, el número de personas que manifestaron presentar la enfermedad, y el número de personas que manifestaron presentar la enfermedad y no consultaron.

#### Plan de recolección de datos

Para la búsqueda activa comunitaria, se utilizó una encuesta estructurada aplicada en cada casa de las manzanas seleccionadas en la muestra; la unidad de observación fueron los habitantes de cada casa. Se hizo una prueba piloto en una manzana no seleccionada en la muestra.

La definición de caso se basó en el diagnóstico clínico y en la autopercepción de la enfermedad; se preguntó a las personas si habían presentado fiebre, dolor articular y erupción en la piel durante el periodo del estudio.

Para la búsqueda activa institucional, se utilizó el módulo Sianiesp del Sivigila en el que se cargaron el 100 % de los RIPS entregados por la Secretaría de Salud de Girardot y, de allí, se seleccionaron los registros que tuvieran el código A920 de la CIE10, el tipo y el número del documento de identidad y el municipio de residencia.

La calidad de los datos se determinó seleccionando los RIPS de cuatro instituciones prestadoras de servicios de salud que agrupaban 59 % de los casos notificados por el municipio de Girardot.

Además, se incluyeron los registros de notificación colectiva e individual del Sivigila provenientes de las mismas cuatro instituciones en el periodo de estudio.

#### Plan de análisis

Los datos se digitaron y analizaron en Epi-Info 7. Se organizaron en distribuciones de frecuencias y sus respectivas proporciones, y se calcularon los estimadores comunitarios con sus respectivas fórmulas. Es importante tener en cuenta que la estimación de estas tasas se hizo 20 semanas después del pico máximo de la epidemia. Las siguientes son las ecuaciones empleadas en los cálculos.

Tasa de ataque:

Subregistro comunitario (SC):

Subregistro institucional (SI):

Para la estimación del subregistro total, se utilizaron las siguientes ecuaciones.

Número de casos de personas que enfermaron, estimado según la tasa de ataque:

Y = población urbana de Girardot x Tasa de ataque

Estimación de la población que enfermó pero no consultó a los servicios de salud (información proveniente de la búsqueda activa comunitaria, PSC):

$$PSC = SC \times Y$$

Estimación de la población que enfermó, pero no se registró en los servicios de salud (PSI):

$$PSI = SI \times (1-SC) Y$$

Estimación del subregistro total de población explicado (ST):

$$ST = PSC + PSI$$

Estimación del subregistro total:

#### Consideraciones éticas

El estudio se clasificó como una investigación sin riesgo, según lo establecido en el Artículo 11, literal A, de la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud. No hubo ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, sicológicas o sociales de los individuos que participaron en el estudio, y se garantizó la absoluta confidencialidad de los datos, los cuales se utilizaron exclusivamente para los fines de esta investigación.

#### Resultados

#### Búsqueda activa comunitaria

En la búsqueda activa comunitaria se incluyeron 132 manzanas del municipio de Girardot, en las cuales se visitaron 1.038 viviendas, en 891 de las cuales se pudieron hacer las entrevistas a 3.380 personas; de ellas 2.189 informaron haber presentado la enfermedad, es decir, una tasa de ataque de 64,7 %.

Se encontraron diferencias estadísticas en la presentación de los casos por sexo, y el mayor número de casos se presentó en mujeres, con 57,7 %; los grupos de edad más afectados fueron el de 15 a 19 años y el de 50 a 54 años. El 50,7 % de los participantes pertenecía al régimen contributivo y el 64,0 % informó haber consultado en algún servicio de salud (cuadro 1).

En cuanto a las causas de falta de consulta de las 789 personas que no asistieron a los servicios de salud, se registraron 929 respuestas, ya que algunas personas informaron más de una causa para no haber consultado. La causa más frecuente fue la automedicación (55,5 %), seguida del colapso en los servicios de salud (28,0 %) (cuadro 2).

El número de casos de la enfermedad por vivienda encuestada fluctuó entre uno y ocho, alcanzando tasas de ataque por vivienda de hasta 100 %.

Según los datos de la búsqueda activa comunitaria, el inicio de la epidemia se registró a partir de la semana epidemiológica 30 del 2014, con un pico máximo en la primera semana epidemiológica de 2015 y un nuevo aumento en la semana epidemiológica 5 de 2015 (figura 1).

**Cuadro 1.** Variables demográficas y sociales de los casos de chikungunya detectados en la búsqueda activa comunitaria, Girardot, noviembre de 2014 a mayo de 2015

Variable	Femenino (n=1.263)	%	Masculino (n=924)	%	Sin dato (n=2)	Total (n=2.189)	%
Tipo de régimen							
Excepción	60	4,8	61	6,6	0	121	5,5
Especial	19	1,5	16	1,7	0	35	1,6
Contributivo	647	51,2	461	49,9	1	1.109	50,7
Subsidiado	445	35,2	283	30,6	0	728	33,3
No asegurado	23	1,8	38	4,1	0	61	2,8
Sin dato	69	5,5	65	7,0	1	135	6,2
Consultó en los servicios de salud							
Sí	845	66,9	553	59,8	2	1.400	64,0
No	418	33,1	371	40,2	0	789	36,0
Grupo de edad (años)		•		•			
0-4	39	3,1	37	4,0	0	76	3,5
5-9	44	3,5	55	6,0	0	99	4,5
10-14	65	5,1	68	7,4	0	133	6,1
15-19	103	8,2	73	7,9	0	176	8,0
20-24	62	4,9	59	6,4	0	121	5,5
25-29	79	6,3	53	5,7	0	132	6,0
30-34	71	5,6	59	6,4	0	130	5,9
35-39	72	5,7	63	6,8	0	135	6,2
40-44	79	6,3	51	5,5	0	130	5,9
45-49	78	6,2	60	6,5	1	139	6,3
50-54	122	9,7	68	7,4	0	190	8,7
55-59	83	6,6	59	6,4	0	142	6,4
60-64	84	6,7	47	5,1	0	131	5,9
65-69	79	6,3	43	4,7	0	122	5,6
70-74	54	4,3	36	3,9	0	90	4,1
75-79	51	4,0	29	3,1	0	80	3,6
80-84	28	2,2	10	1,1	0	38	1,7
85-89	10	0,8	5	0,5	0	15	0,7
90-94	8	0,6	1	0,1	0	9	0,4
95-100	2	0,2	0	0,0	0	2	0,1
Sin dato	50	4,0	48	5,2	1	99	4,5

Fuente: investigación de campo, INS, 2015

**Cuadro 2.** Causas de la falta de consulta en casos de chikungunya captados en la búsqueda activa comunitaria, Girardot, noviembre de 2014 a mayo de 2015

Causas de la falta de consulta	Frecuencia de la falta de consulta (n=789)	%
Automedicación	434	55,0
Colapso en el servicio del	221	28,0
centro médico		
Consultó en la farmacia	86	10,9
El caso era leve	66	8,4
No confía en los médicos	30	3,8
Mal servicio de salud	21	2,7
No tuvo tiempo	19	2,4
Muchos trámites para la cita	9	1,1
Consultó antes y no le	6	0,8
resolvieron nada		
Prefiere ir al curandero	5	0,6
Falta de dinero	4	0,5
Dificultad de acceso al servicio	2	0,3
de salud		
Otra causa	26	3,3

Fuente: investigación de campo, INS, 2015

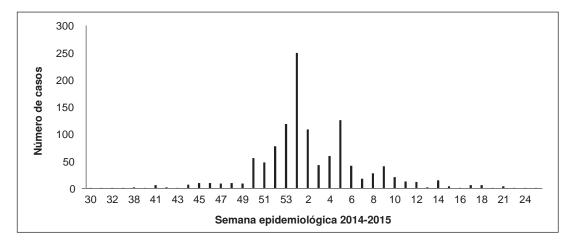
#### Estimación del subregistro comunitario

Con base en el número de casos detectados en la búsqueda activa comunitaria de personas que no consultaron a los servicios de salud (789 casos) y el total de casos detectados (2.189), se estimó un subregistro por falta de consulta de 36,1 % ( $IC_{95\%}$  34,05-38,07).

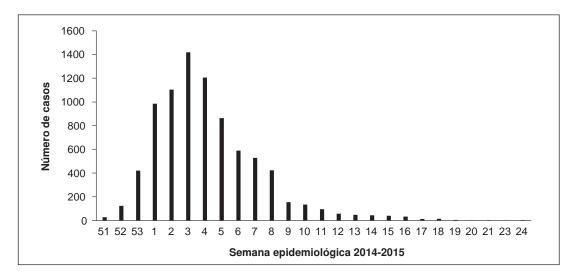
Con base en la tasa de ataque estimada (64,7 %), el subregistro por falta de consulta (36,1 %) y la población urbana del municipio de Girardot (101.610 habitantes), se estimó que 65.030 personas enfermaron de chikungunya y, aproximadamente, 23.410 no consultaron a los servicios de salud por diversas causas.

#### Búsqueda activa institucional

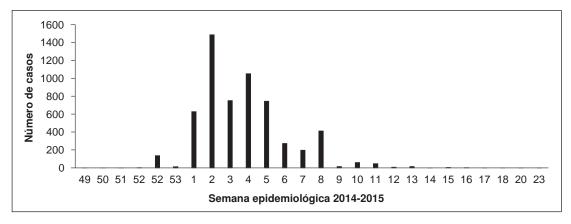
En cuanto a la caracterización de los casos según los RIPS provenientes de las cuatro instituciones de prestación de servicios de salud, se tuvieron en cuenta 6.860 registros, y se encontró que las



**Figura 1.** Distribución de casos de chikungunya de personas que no consultaron a los servicios de salud detectados en la búsqueda activa comunitaria, Girardot, noviembre de 2014 a mayo de 2015 Fuente: búsqueda activa comunitaria, Girardot, 2015



**Figura 2.** Distribución de los casos de chikungunya registrados en los RIPS detectados en la búsqueda activa institucional, Girardot, noviembre de 2014 a mayo de 2015. Fuente: RIPS, Girardot, 2014-2015



**Figura 3.** Distribución de casos de chikungunya registrados en el Sivigila, Girardot, noviembre de 2014 a mayo de 2015 Fuente: Sivigila, Girardot, 2014-2015

mujeres fueron las más afectadas (58 %) y el grupo de edad más frecuente fue el de 25 a 29 años. Según los RIPS, el inicio de la transmisión autóctona se registró durante la semana epidemiológica 51 de 2014, es decir, la tercera semana de diciembre, con un pico máximo de la epidemia entre las semanas epidemiológicas 2 y 4 de 2015 (figura 2).

En cuanto a la notificación individual y colectiva al Sivigila, se encontraron 5.156 registros de las cuatro instituciones de prestación de servicios de salud. El 60 % de los casos notificados se presentaron en el sexo femenino; el grupo de edad más afectado fue el de 25 a 29 años, y el mayor número de casos notificados se registró en la semana epidemiológica 2 de 2015 (figura 3).

#### Estimación del subregistro institucional

Con base en la información del Sivigila (5.156 registros) y de los RIPS (6.860 registros) de las cuatro instituciones, se estimó un subregistro institucional de 24,8 % ( $IC_{95\%}$ , 23,7-25,8).

Según los datos de la tasa de ataque estimada, la población de Girardot y el subregistro institucional (24,8 %), se estimó que hubo 16.265 personas que enfermaron, asistieron a los servicios de salud y no fueron notificadas al Sivigila.

En cuanto a la calidad de los datos de las historias clínicas, se revisaron 171 en dos instituciones de servicios de salud de Girardot, y se encontró que 59,6 % de las personas cumplía con la definición de caso, pero en el diagnóstico principal no se registraron como chikungunya.

Tomando como referencia la tasa de ataque y el número de casos notificados al Sivigila desde el inicio de la epidemia, el subregistro general fue del 87 % ( $IC_{95\%}$  86,79-87,31).

#### Discusión

En este estudio se logró explicar el 60,9 % de este subregistro general de casos. En este sentido, la entidad territorial de salud debe garantizar la ejecución de las actividades de vigilancia y control de manera permanente y rutinaria, sin distinción de sexo, ciclo de vida, nivel socioeconómico o cualquier otra situación, para lo cual se recomienda la reorganización y el mejoramiento de los programas de promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores en el municipio.

La tasa de ataque estimada en la búsqueda activa comunitaria en el municipio de Girardot fue de 64,8 %, calculada 20 semanas epidemiológicas después del pico máximo de transmisión, lo cual se encuentra en los rangos reportados en otros estudios en poblaciones vulnerables, que puede llegar a ser de 40 a 85 % (5,11).

En este estudio, se encontraron diferencias estadísticas en la presentación de los casos. Hubo predominio del sexo femenino en las tres fuentes de información analizadas, lo cual concuerda con otros estudios en los que se indica que las enfermedades transmitidas por este tipo de vectores son más frecuentes en las mujeres debido a que ellas permanecen durante más tiempo en el hogar, donde es común encontrar el mosquito (12). El grupo de edad más afectado, según la información recopilada en la búsqueda activa institucional, correspondió a la población de 25 a 29 años, grupo económicamente activo que usualmente acude a los servicios de salud, en tanto que, en la información recabada en la búsqueda activa comunitaria. los grupos de edad predominantes fueron el de 15 a 19 años y el de 50 a 54 años.

Según los resultados de este estudio, el subregistro por falta de consulta pudo estar relacionado con la gran demanda de servicios de salud que se presentó en el municipio debido a la epidemia, la cual desbordó su capacidad y causó inconformidad entre los afectados, induciéndolos a la automedicación, situación similar a la reportada en la República Dominicana en los seis primeros meses de la epidemia (10).

En cuanto a las causas de la falta de consulta, la más frecuente fue la automedicación, lo cual se explicaría por la baja percepción del riesgo de la enfermedad en la población colombiana, así como por la difusión de la poca letalidad de la enfermedad y la rápida y fácil adquisición de medicamentos para su tratamiento (13).

El subregistro institucional se podría explicar por el hecho de que, en la revisión de las historias clínicas, se encontró un inadecuado registro del diagnóstico principal de chikungunya bajo el código A920 de la CIE 10, aun cuando los pacientes que consultaban cumplían con la definición de caso, lo que impidió que estos ingresaran al sistema de vigilancia bajo esa denominación. Además, la falta de capacitación del personal de salud durante la epidemia, así como, en algunos casos, la consulta a médicos particulares que no notifican al sistema de vigilancia nacional ni generan RIPS, como lo indica la normatividad nacional (14).

Por otro lado, en Girardot algunas instituciones prestadoras de servicios de salud continúan diligenciando las historias clínicas manualmente, lo que no permite estandarizar la consignación de la información en los RIPS, específicamente, en cuanto al registro de los códigos de los diagnósticos según la CIE 10. Esto quiere decir que el registro no se hace de forma simultánea con la atención clínica, ni inmediatamente después de la prestación del servicio, lo cual es objeto de revisión en el marco de la normatividad vigente (15). Asimismo, genera dificultades en la lectura de los diagnósticos a la luz de la definición de caso de los RIPS, ya que no se garantizan la calidad, la confiabilidad y la validez de los datos, pues se incrementa la posibilidad del error humano al adicionarse un paso en la obtención y el registro de la información (16,17).

El brote de chikungunya en Girardot tuvo una rápida diseminación, favorecida por el hecho de que se trataba de un virus nuevo en la región, por la población que podía enfermar y por factores de riesgo como la adaptabilidad del virus al vector, así como por factores ambientales y sociales que favorecieron la transmisión, tal como se observó en otras ciudades del departamento de Cundinamarca y del país (7,8,18).

Las secretarías municipales de salud deben hacer seguimiento continuo del cumplimiento de los lineamientos nacionales y de la búsqueda activa institucional en todas las instituciones prestadoras de servicios de salud, para mejorar la notificación al sistema de vigilancia en salud pública del municipio, en cumplimiento de la estrategia nacional de fortalecimiento de la autoridad sanitaria para la gestión de la salud.

Se sugiere mejorar las capacidades específicas del personal de la salud a partir de la formación que ofrecen las diferentes universidades en sus programas de pregrado y posgrado, así como en las instituciones prestadoras de servicios de salud, con el fin de sensibilizarlo frente a la importancia del reporte a los sistemas de información en salud en cumplimiento del Decreto 3518 del 2006.

Es necesario revisar la efectividad de la estrategia de comunicación en cuanto a la percepción del riesgo por parte de la comunidad como causa de subregistro. Tal estrategia debe reconocer las diferencias sociales de los grupos más vulnerables, y articularse con los sectores de la salud, la educación, la cultura, el ambiente, el turismo, y con las organizaciones sociales y comunitarias del municipio, para promover las actividades intersectoriales relacionadas con la iniciativa de entornos saludables en el ámbito escolar y en la comunidad.

Se sugiere el desarrollo de estudios en el nivel territorial, con el fin de crear espacios participativos para las poblaciones afectadas y generar propuestas alternativas de prevención y control del hábitat del vector que tengan en cuenta las diferencias de estratos socioeconómicos, factores ambientales y número de habitantes en las viviendas, entre otras características propias del municipio.

Los resultados relacionados con el colapso de los servicios de salud durante la emergencia como causa de la falta de consulta, deben tenerse en cuenta para prever situaciones similares en el futuro y proponer estrategias de reorganización de los servicios de salud en otros municipios y en el país, de manera que se incluya a los actores responsables de la salud pública y de los entes territoriales en el manejo de los brotes y epidemias de enfermedades transmitidas por el mismo vector, como las infecciones por los virus del Zika, del dengue y el mayaro.

Entre las limitaciones del estudio, debe mencionarse que la definición de caso utilizada para la búsqueda activa institucional se basó en la clínica y la autopercepción de la enfermedad, lo que puede aumentar el número de casos percibidos en la comunidad o excluir casos asintomáticos. Asimismo, es importante tener en cuenta el sesgo de información, dado que el periodo de estudio fue aproximadamente de siete meses y es posible que las fechas de inicio de los síntomas reportadas por las personas no sean exactas.

#### **Agradecimientos**

Los autores agradecen a las autoridades del municipio de Girardot por su colaboración y el apoyo brindado para hacer posible esta investigación.

#### Conflicto de intereses

Los investigadores declaran que no tienen conflicto de intereses.

#### Financiación

El presente estudio fue financiado exclusivamente con recursos del Instituto Nacional de Salud.

#### Referencias

- Organización Panamericana de la Salud. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus Chikungunya en las Américas. Washington, D.C.: OPS, CDC: 2011
- Porta L. Fiebre Chikungunya. Amenaza para la región de las Américas. Salud Militar. 2012;31:25-33.
- 3. **Instituto Mexicano del Seguro Social.** Prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección por el virus Chikungunya.

- Fecha de consulta: 14 de febrero del 2016. Disponible en: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/ChikungunyaCENETEC\_GER.pdf
- Rodríguez AJ, Urbano SF, Cardona JA, Hurtado JS. Prevalence of post-Chikungunya chronic inflammatory rheumatism: A systematic review and meta-analysis. Arthritis Care Res (Hoboken). 2016;68:1849-58. https://doi. org/10.1002/acr.22900
- Alladí M, Kiran D, Chiranjeevi M, Prabath K. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of chikungunya fever: Lessons learned from the re-emerging epidemic. Indian J Dermatol. 2010;55:54-63. https://doi.org/10.4103/0019-5154.60355
- Organización Mundial de la Salud; Organización Panamericana de la Salud. Información para proveedores de asistencia sanitaria. Fecha de consulta: 2 de junio del 2015. Disponible en: www.paho.org/hq/index. php%3Foption%3Dcom\_docman%26task%3Ddoc\_downlo ad%26gid%3D23977%26Itemid%3D%26lang%3Des+&cd =1&hl=es&ct=clnk&gl=co.
- Moya J, Pimentel R, Puello J. Chikungunya: un reto para los servicios de salud de la República Dominicana. Rev Panam Salud Pública. 2014;36:331-5.
- Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica número 17 de 2015 (26 de abril a 02 de mayo). Fecha de consulta: 27 de mayo del 2015. Disponible en: http://www.ins.gov.co/ boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2015%20 Boletin%20epidemiologico%20semana%2017.pdf
- Chaparro P, Soto E, Vargas D. Estimación del subregistro de casos de paludismo en diez municipios de la costa del Pacífico nariñense durante 2009. Biomédica. 2012;32:29-37. https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i0.456
- Pimentel R, Skewes R, Moya J. Chikungunya en la Republica Dominicana: lecciones aprendidas en los primeros seis meses. Rev Panam Salud Pública. 2015;36:336-41.

- Restrepo BN. Infección por el virus del Chikungunya. Rev CES Med. 2014;28:313-23.
- Calderón EA, Blanco L. La enfermedad de dengue en colaboradores cubanos en el estado de Nueva Esparta: Año 2007. Rev Med Electrón. 2010;32:1-6.
- Martínez M, Gómez S. Chikungunya en Colombia, el inicio de la transmisión autóctona, 2014. Inf Quin Epidemiol Nac. 2014;19:261-79.
- 14. Ministerio de Salud Pública República Dominicana. Guía de manejo clínico para la infección por el virus de Chikungunya (CHIKV). Fecha de consulta: 27 de mayo de 2015. Disponible en: http://www1.paho.org/dor/images/ stories/archivos/chikungunya/guia\_chikv2.pdf
- Ministerio de Salud. Resolución 1995 de 1999. Fecha de consulta: 27 de junio del 2015. Disponible en: https:// www.minsalud.gov.co/Normatividad\_Nuevo/RESOLUCI %C3%93N%201995%20DE%201999.pdf
- 16. Rampatige R, Mikkelsen L, Gamage S, Peiris S. Promoting the periodic assessment of the quality of medical records and cause-of-death data: Lessons learned from a medical records study in Sri Lanka. Fecha de consulta: 26 de abril de 2016. Disponible en: http://www.uq.edu.au/hishub/docs/ WP14/HISHUB-WP14-07-PRESS-24Ju12.pdf.
- Montañéz RA, Montenegro JJ, Vásquez R. Pérdida de información en historias clínicas: más allá de la calidad en el registro. Rev Med Chile. 2015;143:812. https://doi. org/10.4067/S0034-98872015000600017
- Campo A, Benavides M, Martínez M, Caro OA, Gómez JA, Nieto DL, et al. Brote de Chikungunya en el municipio de Mahates, Bolívar 2014. Inf Quin Epidemiol Nac. 2014; 19:342-67.

#### ARTÍCULO ORIGINAL

# Microbiota periodontal y microorganismos aislados de válvulas cardiacas en pacientes sometidos a cirugía de reemplazo de válvulas en una clínica de Cali, Colombia

Sandra Moreno<sup>1</sup>, Beatriz Parra<sup>2</sup>, Javier E. Botero<sup>3</sup>, Freddy Moreno<sup>1</sup>, Daniel Vásquez<sup>4</sup>, Hugo Fernández<sup>5</sup>, Sandra Alba<sup>5</sup>, Sara Gallego<sup>5</sup>, Gilberto Castillo<sup>5</sup>, Adolfo Contreras<sup>4,6</sup>

- 1 Grupo de Investigación en Ciencias Básicas y Clínicas de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana Cali, Cali, Colombia
- <sup>2</sup> Grupo de Investigación Virem, Departamento de Microbiología, Universidad del Valle, Cali, Colombia
- <sup>3</sup> Facultad de Odontología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
- <sup>4</sup> Grupo de Investigación en Medicina Periodontal, Universidad del Valle, Cali, Colombia
- <sup>5</sup> Instituto de Investigaciones, Centro Médico Imbanaco, Cali, Colombia
- <sup>6</sup> Centro para el Desarrollo y Evaluación de Políticas y Tecnología en Salud Pública, CEDETES, Escuela de Salud Pública, Universidad del Valle, Cali, Colombia

**Introducción.** La periodontitis es una enfermedad infecciosa que afecta los tejidos de soporte del diente y se asocia con diferentes enfermedades sistémicas, incluida la enfermedad cardiovascular. Los estudios microbiológicos permiten detectar microorganismos a partir de muestras subgingivales y cardiovasculares.

**Objetivo.** Describir la microbiota periodontal cultivable y la presencia de microorganismos en válvulas cardiacas de pacientes sometidos a cirugía de reemplazo valvular en una clínica de Cali.

**Materiales y métodos.** Se analizaron 30 muestras subgingivales y de tejidos valvulares mediante cultivo en medio bifásico, agar de sangre con suplemento y agar tripticasa de soya con antibiótico. Las muestras de las válvulas se analizaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional.

Resultados. Los patógenos periodontales aislados de bolsas periodontales fueron Fusobacterium (50 %), Prevotella intermedia/nigrescens (40 %), Campilobacter rectus (40 %), Eikenella corrodens (36,7 %), bacilos entéricos Gram negativos (36,7 %), Porphyromonas gingivalis (33,3 %) y Eubacterium (33,3 %). Los agentes patógenos aislados de la válvula aórtica fueron Propionibacterium acnes (12 %), bacilos entéricos Gram negativos (8 %), Bacteroides merdae (4 %) y Clostridium bifermentans (4 %), y de la válvula mitral, P. acnes y Clostridium beijerinckii. La PCR convencional no arrojó resultados positivos para agentes patógenos orales y solo se detectó ADN bacteriano en dos muestras.

**Conclusiones.** La microbiota periodontal de pacientes sometidos a cirugía de reemplazo valvular estaba conformada por especies Gram negativas que han sido relacionadas con infecciones en tejidos extraorales; sin embargo, no se encontraron agentes patógenos periodontales en los tejidos de las válvulas. Aunque hubo muestras de estos tejidos y subgingivales, positivas para bacilos entéricos Gram negativos, no es posible asegurar que tuvieran el mismo origen filogenético.

Palabras clave: microbiota; periodontitis; enfermedades cardiovasculares; válvulas cardiacas; virulencia; bacteriemia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3232

Periodontal microbiota and microorganisms isolated from heart valves in patients undergoing valve replacement surgery in a clinic in Cali, Colombia

**Introduction:** Periodontitis is an infectious disease that affects the support tissue of the teeth and it is associated with different systemic diseases, including cardiovascular disease. Microbiological studies facilitate the detection of microorganisms from subgingival and cardiovascular samples.

#### Contribución de los autores:

Sandra Moreno: coordinación del equipo de trabajo y del transporte de las muestras, cultivos y PCR

Beatriz Parra: estandarización de los métodos de laboratorio y pruebas moleculares en el tejido valvular

Javier Botero: análisis de los periodontogramas, examen clínico de los participantes y diagnóstico periodontal

Freddy Moreno: proceso de laboratorio

Daniel Vásquez: métodos de estandarización, cultivos y pruebas moleculares de las muestras

Hugo Fernández, Sandra Alba y Gilberto Castillo: toma de la muestra valvular

Sara Gallego: toma de la muestra subgingival, toma del periodontograma y examen clínico

Adolfo Contreras: coordinación del equipo de trabajo, estandarización de los métodos de laboratorio y lectura de cultivos microbiológicos, pruebas moleculares

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

**Objective:** To describe the cultivable periodontal microbiota and the presence of microorganisms in heart valves from patients undergoing valve replacement surgery in a clinic in Cali.

**Materials and methods:** We analyzed 30 subgingival and valvular tissue samples by means of twophase culture medium, supplemented blood agar and trypticase soy agar with antibiotics. Conventional PCR was performed on samples of valve tissue.

**Results:** The periodontal pathogens isolated from periodontal pockets were: *Fusobacterium nucleatum* (50%), *Prevotella intermedial nigrescens* (40%), *Campylobacter rectus* (40%), *Eikenella corrodens* (36.7%), Gram negative enteric bacilli (36.7%), *Porphyromonas gingivalis* (33.3%), and *Eubacterium* spp. (33.3%). The pathogens isolated from the aortic valve were *Propionibacterium acnes* (12%), Gram negative enteric bacilli (8%), *Bacteroides merdae* (4%), and *Clostridium bifermentans* (4%), and from the mitral valve we isolated *P. acnes* and *Clostridium beijerinckii*. Conventional PCR did not return positive results for oral pathogens and bacterial DNA was detected only in two samples.

**Conclusions:** Periodontal microbiota of patients undergoing surgery for heart valve replacement consisted of species of Gram-negative bacteria that have been associated with infections in extraoral tissues. However, there is no evidence of the presence of periodontal pathogens in valve tissue, because even though there were valve and subgingival samples positive for Gram-negative enteric bacilli, it is not possible to maintain they corresponded to the same phylogenetic origin.

**Key words:** Microbiota; periodontitis; cardiovascular diseases; heart valves; virulence, bacteremia. doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3232

La periodontitis es una enfermedad crónica que responde a múltiples factores y afecta los tejidos de soporte del diente, con un componente infeccioso importante (1) conformado por una biopelícula de diversas especies (2), lo que hace más complejo su control y tratamiento (3).

Al igual que otras infecciones crónicas, la periodontitis se ha relacionado con la enfermedad cardiovascular (4,5), la cual también se clasifica dentro de las enfermedades causadas por múltiples factores, o complejas, y comparte factores de riesgo como la obesidad, el consumo de tabaco, la diabetes, el estrés y el bajo nivel socioeconómico, entre otros (6); esto dificulta establecer una relación directa de causa y efecto entre las dos enfermedades.

Sin embargo, existen dos puntos importantes de conexión entre las dos. El primero tiene que ver con el microbioma periodontal (7), el cual está conformado principalmente por bacterias anaerobias Gram negativas organizadas en biopelículas, con capacidad de generar bacteriemias y migrar a otros tejidos (5,8,9), donde las toxinas y factores de virulencia, como el lipopolisacárido, dan lugar a un proceso de destrucción del tejido induciendo mecanismos de agregación plaquetaria y liberación de especies reactivas del oxígeno (7). Además, bacterias como *Porphyromonas gingivalis* pueden

Correspondencia:

Sandra Moreno, Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana, Calle 18 N° 118-250, Edificio Raúl Posada, 2 piso, Cali, Colombia

Teléfono: (572) 321 8200, extensión 8780 smmoreno@javerianacali.edu.co

Recibido: 07/03/16; aceptado: 20/01/17

migrar a los grandes vasos utilizando los monocitos y los eritrocitos (10) y, una vez allí, sus mecanismos de virulencia inducen un proceso inflamatorio y la secreción de mediadores químicos relacionados con la formación de las placas ateromatosas (11).

El segundo punto tiene que ver con la inflamación (9), la cual es crónica en la periodontitis debido al estímulo sostenido del sistema inmunitario y su falta de acción efectiva frente a las bacterias inmersas en la biopelícula (12); ello hace que las citocinas proinflamatorias, liberadas por células fagocíticas hiperactivadas y poco reguladas, entren al torrente sanguíneo, generen una acción endocrina en el hígado e induzcan la secreción de proteínas de fase aguda, entre ellas, la proteína C reactiva (13,14); esta es una potente opsonina con actividad depuradora, así como marcador importante de la inflamación sistémica y el riesgo cardiovascular, principalmente por su capacidad de actuar en la célula endotelial e inducir la liberación y expresión de moléculas proinflamatorias y propiciadoras de la agregación plaquetaria (15,16).

En varios estudios con diferentes diseños epidemiológicos, se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre estas dos enfermedades (17); sin embargo, el riesgo relativo de enfermedad cardiovascular en pacientes con enfermedad periodontal es bajo y puede atribuirse a varios factores de confusión que no se han tenido en cuenta en el diseño de los estudios o que han sido ajustados incorrectamente en el análisis estadístico (18).

La presencia de microrganismos patógenos en el periodonto constituye un reto para el tejido local y

para el sistema inmunológico, pues predispone al desarrollo de enfermedades en los tejidos de los vasos (13) y las válvulas cardiacas (4).

El objetivo del presente estudio fue describir la microbiota periodontal cultivable de pacientes con enfermedad periodontal y enfermedad en las válvulas cardiacas, así como evaluar la presencia de microorganismos en las de aquellos sometidos a cirugía de reemplazo valvular en una clínica de Cali.

#### Materiales y métodos

#### Población y muestra

Se seleccionaron 30 pacientes con diagnóstico de enfermedad cardiovascular atendidos en el Centro Médico Imbanaco de Cali, Colombia, en espera de la cirugía de reemplazo valvular. Cabe resaltar que todos los pacientes incluidos en el estudio, avalado por el Comité de Ética en Investigación del Centro Médico Imbanaco mediante el Acta CEI-109, firmaron previamente el consentimiento informado.

Los pacientes eran mayores de edad, con cinco o más dientes en boca, y no habían recibido tratamiento periodontal o higiene dental profesional en los seis meses anteriores a su inclusión en el estudio.

#### Toma de muestras y examen clínico periodontal

Los sujetos de la muestra fueron atendidos en el Servicio de Odontología antes de ser sometidos a la cirugía cardiovascular, como parte del protocolo de ambientación de la cavidad oral. Se les hizo un examen clínico odontológico y sondaje periodontal de boca completa a cargo de odontólogos previamente estandarizados con un periodoncista, según los criterios diagnósticos de 1999 de la *American Academy of Periodontology* (AAP).

La estandarización fue evaluada con el índice kappa de concordancia y arrojó un valor de 87,4 %. Posteriormente, se tomó una muestra subgingival.

Los pacientes fueron diagnosticados por un periodoncista experto, quien analizó los periodontogramas, ajustándose a los criterios diagnósticos de la *American Academy of Periodontology* de 1999 (19). En el periodontograma, se incluyeron las variables clínicas de pérdida de inserción clínica, sangrado con el sondaje, profundidad en el sondaje y número de dientes perdidos.

Bajo aislamiento relativo del campo operatorio, las muestras se tomaron de las bolsas más profundas (>4 mm), en los pacientes con periodontitis, y del aspecto mesial vestibular de los cuatro primeros molares, en pacientes con gingivitis, utilizando puntas estériles de papel número 40 que se mantuvieron dentro del surco gingival durante un minuto. Posteriormente, se depositaron en un vial con el medio de transporte anaerobio VMGA III (Viability Medium Göteborg Agar) y se llevaron al laboratorio donde se cultivaron inmediatamente.

## Cultivos microbiológicos de las muestras subgingivales

Se hicieron cultivos microbiológicos de las muestras subgingivales en agar TSBV y en agar brucella con suplemento de sangre de cordero al 5 %, hemina y menadiona. Para la identificación de *P. gingivalis, Prevotella intermedia/nigrescens, P. melaninogenica, Tannerella forsythensis, Eikenella corrodens* y *Fusobacterium* spp., se hicieron cinco diluciones en base 10 a partir del medio VMGA III, se sembraron 100 µl de las diluciones 10-3, 10-4 y 10-5 en agar brucella sangre enriquecido con hemina y menadiona, y se llevaron a incubación a 36 °C en atmósfera de anaerobiosis durante siete días.

Para la recuperación de *Aggregatibacter actino-mycetemcomitans* se utilizaron cajas de agar TSBV incubadas en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % durante tres a cinco días.

Para el aislamiento de bacilos entéricos Gram negativos, se utilizó agar MacConkey, y se incubaron en una atmósfera aerobia a 37 °C durante 24 a 48 horas. Para su identificación, se utilizó el sistema comercial Crystal E/NF.

Después de la incubación, se calculó el número total de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) de cada muestra. El porcentaje relativo de recuperación de cada microorganismo se calculó a partir del total de UFC por mililitro (20).

#### Toma de muestras valvulares

Durante la cirugía de reemplazo valvular, el cirujano cardiovascular extrajo los especímenes de las válvulas cardiacas aórtica o mitral, y estos se sumergieron en una botella estéril con 50 ml de solución salina y se llevaron inmediatamente al laboratorio donde los explantes se cortaron en finos fragmentos de 1 mm, aproximadamente, en una cabina de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

La mitad de la muestra se utilizó para el cultivo microbiológico de los tejidos y la otra mitad se almacenó a -70 °C en tubos Eppendorff rotulados para someterlos a la PCR. Una parte de la muestra de tejido cardiaco se homogeneizó en 4 ml de

PBS estéril. A continuación, se adicionaron 2 ml del tejido homogeneizado a un medio bifásico Ruiz Castañeda con suplemento de hemina y menadiona; 1 ml se adicionó en caldo tripticasa de soya, también con suplemento de estos componentes; por último, volúmenes de 100 µl por superficie se sembraron por duplicado en agar TSVB y agar brucella enriquecido (sangre de cordero desfibrinada, hemina y menadiona).

El caldo tripticasa y el agar brucella se incubaron en anaerobiosis, en tanto que el medio Ruiz Castañeda se incubó en condiciones aerobias a 37 °C durante 14 días, y el TSVB, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % durante tres a cinco días. A continuación, se extrajeron alícuotas de 100 µl de cada uno de los dos caldos, se cultivaron por duplicado en TSVB y se incubaron en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % durante tres a cinco días, y en agar brucella enriquecido incubado en anaerobiosis a 37 °C durante ocho a 14 días.

#### Identificación de microorganismos

La identificación de los microorganismos se hizo mediante la observación de características morfológicas con un esteromicroscopio Stemi 2000-C™ (Zeiss) y, posteriormente, se confirmó utilizando el estuche comercial para la identificación de microorganismos anaerobios RapID ANAII System™ (REMEL). Para la identificación de los aislamientos bacterianos obtenidos en los cultivos de tejido valvular, se utilizó la tinción de Gram, la prueba de la catalasa y el estuche comercial RapID ANAII System™ (REMEL).

#### Extracción de ADN de las muestras valvulares

Otra parte de la muestra valvular se utilizó para las pruebas de PCR. Se tomaron 15 mg de tejido previamente fragmentado en condiciones de esterilidad y se sometieron a digestión en solución tampón de digestión proteolítica (Tris HCL 1M, SDS al 20 %, EDTA 0,5M y proteinasa K 20 mg/ml) durante 18 horas a 56 °C.

Posteriormente, se extrajo una alícuota y se procesó utilizando el estuche comercial de extracción y purificación de ADN High Pure Viral Nucleic Acid™ de Roche, previamente seleccionado y verificado mediante un ensayo de efectividad para la extracción de ADN a partir de un tejido infectado experimentalmente en diferentes concentraciones.

Para evaluar la extracción del ADN, se hizo una prueba de PCR para la detección del gen humano *GADPH* (figura 1).

#### Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR convencional para la detección del ADN de bacterias periodontales en tejido cardiaco, se practicó en un termociclador Gene Amp PCR systems 9700™ (Applied Biosystems) con el siguiente programa de amplificación: desnaturalización a 95 °C durante 2 minutos, seguida de 36 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, a 60 °C durante 1 minuto, a 72 °C durante 1 minuto y una extensión final a 72 °C durante 2 minutos para la detección del ADN bacteriano de *P. gingivalis, Tannerella forsythia, Treponema denticola, Campylobacter rectus y E. corrodens.* 

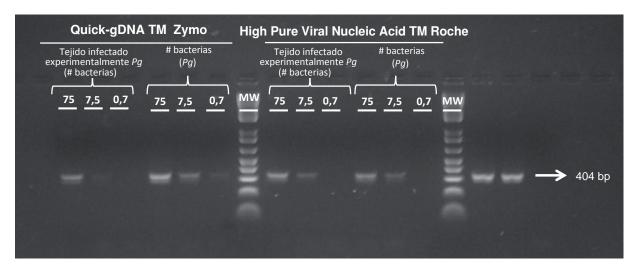


Figura 1. Ensayo de efectividad con los estuches comerciales Quick-gDNA™ (Zymo) y High Pure Viral Nucleic Acid™ (Roche) para la extracción de ADN en tejidos infectados experimentalmente.

Para la detección de *P. intermedia/nigrescens*, *A. actinomycetemcomitans* y *Dialister pneumosintes*, se utilizó el siguiente programa: desnaturalización a 95 °C durante 2 minutos, seguida de 36 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, a 55 °C durante 1 minuto, a 72 °C durante 2 minutos y una extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Se utilizaron los iniciadores de los ocho microorganismos periodontales patógenos previamente descritos (21), y controles positivos y negativos en cada ensayo. A todas las muestras se les hizo la detección de iniciadores ubicuos para comprobar la presencia de ADN bacteriano.

El producto de amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 2 % (Ultrapure Agarose™ de Invitrogen) con SyBRSafe™ (DNA gel stain de Invitrogen). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen) para indicar el peso de la banda amplificada.

#### Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo con el programa estadístico Stata 12<sup>™</sup>. Inicialmente, se hizo un análisis exploratorio con fines de control de calidad y se verificó la calidad de la información. Posteriormente, se hizo un análisis descriptivo de todas las variables y se construyeron las tablas de frecuencia.

Las variables categóricas se reportaron en frecuencias absolutas y porcentajes. Para las variables numéricas, se verificó la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Una vez validado este supuesto, se reportaron el promedio y la desviación estándar (DE), y en los otros casos, la mediana, así como el rango (R) o el rango intercuartílico (RI).

Para la comparación de las variables categóricas, se utilizó la prueba de ji al cuadrado o la prueba exacta de Fisher. Para las variables numéricas, se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, ya que la distribución de los datos estaba sesgada. En estos análisis se consideró un valor de p<0,05 para establecer diferencias estadísticamente significativas.

#### Resultados

En el estudio participaron 30 sujetos (19 hombres y 11 mujeres) sometidos a cirugía cardiovascular para reemplazo de válvula cardiaca, con diagnóstico previo de enfermedad periodontal; su mediana de edad era de 60,5 años (RI=20-77). La mayoría de los sujetos dijeron no consumir alcohol (90 %) ni tabaco (80 %) o drogas alucinógenas (100 %).

Los siguientes eran sus antecedentes patológicos: hipertensión (43,3 %) e insuficiencia de la válvula aórtica (73,1 %) (cuadro 1).

Las variables clínicas periodontales fueron las siguientes: nivel de pérdida de inserción clínica con una variación entre 0,4 y 4,6 (mediana=1,3; RI=0,7-2,0); la profundidad en el sondaje varió entre 1,4 y 3,8 (mediana=1,9; RI=1,6-2,3); la mediana del número de dientes perdidos fue de 12,5 (RI=5-19) y la del sangrado en el sondaje fue de 7 (RI=2,8-10).

El diagnóstico periodontal más frecuente fue gingivitis (36,7 %), seguido de periodontitis crónica leve localizada (26,7 %), periodontitis crónica moderada localizada (26,7 %) y periodontitis crónica grave localizada (10 %) (cuadro 2).

**Cuadro 1.** Análisis descriptivo de las características sociodemográficas, hábitos de higiene oral, otros hábitos y antecedentes de los pacientes sometidos a cirugía cardiovascular para reemplazo de válvula cardiaca con diagnóstico previo de enfermedad periodontal (N=30)

Variables sociodemográficas	Medi n	ana (RI) (%)
Edad (años)	60,5	(20-77)
Sexo		
Femenino	11	(36,7)
Masculino	19	(63,3)
Hábitos		
Consumo de alcohol		
Nunca	27	(90,0)
Poco frecuente (una vez por	3	(10,0)
mes o menos)		
Consumo de tabaco		
Nunca	24	(80,0)
Muy frecuente (mínimo una vez al día)	3	(10,0)
En los tres o seis meses previos	2	(6,7)
En un periodo menor de los tres	1	(3,3)
meses previos		
Consumo de drogas		(400)
Nunca	30	(100)
Antecedentes clínicos		
Enfermedades sistémicas		
Amigdalitis crónica	1	(3,3)
Diabetes	3	(10,0)
Endocarditis	1	(3,3)
Gastroenteritis	1	(3,3)
Hipertensión arterial	13	(43,3)
Hipertensión arterial e hipercolesterolemia	5	(16,7)
Hipertensión arterial e hipertiroidismo	1	(3,3)
Hipotiroidismo	3	(10,0)
Ninguna	2	(6,7)
Enfermedad cardiovascular		
Insuficiencia de válvula aórtica	19	(73,1)
Endocarditis en válvula nativa aórtica	1	(3,9)
Insuficiencia de válvula mitral	1	(3,9)
Estenosis crítica en válvula aórtica	4	(15,4)
Tetralogía de Fallot	1	(3,8)

**Cuadro 2.** Análisis de variables clínicas periodontales de pacientes sometidos a cirugía cardiovascular para reemplazo de válvula cardiaca con diagnóstico previo de enfermedad periodontal (N=30)

Variables clínicas		ediana 6) (RI)
Número de dientes perdidos	12,	5 (5-19)
Nivel de inserción clínica	1,3	3 (0,7-2,0)
Porcentaje de sangrado	7	(2,8-10)
Profundidad en el sondaje	1,9	9 (1,6-2,3)
Diagnóstico periodontal		
Sano	0	
Gingivitis	11	(36,7)
Periodontitis leve	8	(26,7)
Periodontitis moderada	8	(26,7)
Periodontitis grave	3	(10,0)

Los patógenos periodontales más frecuentes aislados a partir de las muestras de las bolsas periodontales, fueron *Fusobacterium* spp. (50 %), *P. intermedia/nigrescens* (40 %), *C. rectus* (40 %), *E. corrodens* (36,7 %), bacilos entéricos Gram negativos (36,7 %), *P. gingivalis* (33,3 %), y *Eubacterium* spp. (33,3 %) (cuadro 3).

Es importante mencionar que los sitios de donde se tomaron las muestras mostraron signos inflamatorios, sangrado en el sondaje, y alteración en la arquitectura y morfología del tejido, así como una mayor profundidad en el sondaje o pérdida de inserción clínica.

Los agentes patógenos aislados de la válvula cardiaca aórtica fueron principalmente colonias que no fue posible identificar mediante los métodos microbiológicos clásicos (24 %), seguidas de *Propionibacterium acnes* (12 %), bacilos entéricos Gram negativos (8 %), *Bacteroides merdae* (4 %) y *Clostridium bifermentans* (4%). En tres válvulas (12%), se encontró un número incontable de colonias.

Se aislaron agentes patógenos de la válvula cardiaca mitral solo en cuatro pacientes. En uno de los aislamientos se hallaron colonias inidentificables mediante los métodos microbiológicos clásicos, así como una caja con un número incontable de colonias (cuadro 4).

El proceso de extracción del ADN de las válvulas cardiacas se comprobó mediante la detección molecular de un gen conservado humano (*GADPH*) en todas las muestras procesadas (figura 1). Después de verificar la correcta extracción del ADN, se hicieron las pruebas de PCR para cada muestra, inicialmente, con los iniciadores específicos estandarizados en el laboratorio para

cada microorganismo patógeno periodontal, pero dados los resultados negativos, se usaron iniciadores ubicuos con los cuales se detectó ADN bacteriano en la válvula #22 y en la #8 (figura 2).

#### Discusión

Las enfermedades periodontales, como la gingivitis y la periodontitis crónica, condiciones halladas en el grupo de pacientes incluido en el presente estudio, son inflamaciones compatibles con las infecciones inducidas por microorganismos periodontales patógenos como los identificados mediante el cultivo de las muestras subgingivales mencionados en la sección de resultados, y reportados también por otros autores en estudios previos (22), incluso en la población colombiana (23-25).

Estas infecciones crónicas por microrganismos organizados en biopelículas subgingivales (2,3) constituyen un desafío constante para los pacientes, pues alteran la homeostasis (1) oral y de otros sistemas (13).

En los participantes del estudio se presentaron antecedentes clínicos patológicos (cuadro 1) que podían aumentar la gravedad de la enfermedad periodontal. Además, la infección crónica y la inflamación del periodonto, sumadas a factores como la dieta, el sedentarismo y otros, estimulan el desarrollo y la complicación de condiciones como la diabetes (26,27) y la hipertensión (28), las cuales se contaban entre las condiciones más frecuentes en este grupo de pacientes.

**Cuadro 3.** Resultados de cultivos orales de los pacientes con diagnóstico previo de enfermedad periodontal sometidos a cirugía cardiovascular para reemplazo de válvula cardiaca (N=30)

Agentes patógenos en surco gingival	Cultivos positivos n (%)	Porcentaje de bacterias Mediana (RI)
Porphyromonas gingivalis <sup>a</sup>	10 (33,3)	0 (0-0,5)
Prevotella intermedia/nigrescensa	12 (40,0)	0 (0-3)
Tannerella forsythia <sup>b</sup>	2 (6,7)	0 (0-0)
Campylobacter rectus <sup>a</sup>	12 (40,0)	0 (0-1,7)
Eikenella corrodens <sup>a</sup>	11 (36,7)	0 (0-0,9)
Aggregatibacter	2 (6,7)	0 (0-0)
actinomycetemcomitans <sup>b</sup>		
Eubacterium spp. <sup>b</sup>	10 (33,3)	0 (0-0,9)
Dialister pneumosintes <sup>b</sup>	6 (20,0)	0 (0-0)
Bacilos entéricos Gram negativos <sup>b</sup>	11 (36,7)	0 (0-0,0)
Fusobacterium spp.a	15 (50,0)	0,8 (0-3,2)
Treponema denticolaª	0 (0,0)	0 (0-0)
Estreptocos β <sup>b</sup>	0 (0,0)	0 (0-0)
Levaduras <sup>b</sup>	6 (20,0)	0 (0-0)

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Prueba de ji al cuadrado

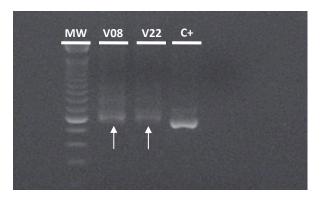
<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> Prueba exacta de Fisher

**Cuadro 4.** Resultados de los cultivos y la PCR de las válvulas cardiacas aórtica y mitral de los pacientes con diagnóstico previo de enfermedad periodontal sometidos a cirugía cardiovascular para reemplazo de válvula cardiaca

Patógenos	Válv	ulas
	Aórtica (n=24)	Mitral (n=4)
	Cultivos positivos n (%)	Cultivos positivos n (%)
Porphyromonas gingivalis	0 (0,0)	0 (0,0)
Prevotella intermedia/nigrescens	0 (0,0)	0 (0,0)
Tannerella forsythensis	0 (0,0)	0 (0,0)
Campylobacter rectus	0 (0,0)	0 (0,0)
Eikenella corrodens	0 (0,0)	0 (0,0)
Aggregatibacter	0 (0,0)	0 (0,0)
actinomycetemcomitans		
Eubacterium spp	0 (0,0)	0 (0,0)
Dialister pneumosintes	0 (0,0)	0 (0,0)
Bacilos entéricos Gram negativos	2 (8,0)	0 (0,0)
Fusobacterium spp	0 (0,0)	0 (0,0)
Treponema denticola	0 (0,0)	0 (0,0)
Estreptococos β	0 (0,0)	0 (0,0)
Levaduras	0 (0,0)	0 (0,0)
Propionibacterium acnes	3 (12,0)	1 (25,0)
Clostridium beijerinckii	0 (0,0)	1 (25,0)
Clostridium bifermentans	1 (4,0)	0 (0,0)
Bacteroides distasonis	0 (0,0)	0 (0,0)
Bacteroides merdae	1 (4,0)	0 (0,0)
Colonias sin identificar	6 (24,0)	1 (25,0)
Número incontable de colonias	3 (12,0)	1 (25,0)
PCR		
ADN bacteriano	2 (8,0)	0 (0,0)

Por otro lado, 73,1 % de los pacientes presentaba insuficiencia de la válvula aórtica, para lo cual la presencia de microorganismos en la cavidad oral es un riesgo que pone en peligro la vida, ya que el cepillado, el uso de seda dental y la masticación facilitan su entrada en la circulación (29) y su migración a diferentes tejidos (13), entre ellos, los vasculares (9,11), incluidos los de las válvulas cardiacas (30). Esto puede aumentar la gravedad de la enfermedad y mantener el estado proinflamatorio. Sin embargo, la mayoría de estudios sobre la presencia de microorganismos periodontales patógenos en muestras cardiovasculares, se ha realizado en ateromas (9,11,31-33), y en los estudios relacionados con válvulas cardiacas, se han reportado principalmente patógenos como Streptococcus mutans (34).

En el presente estudio, se analizaron los especímenes obtenidos de las válvulas aórtica y mitral de pacientes en condiciones asépticas durante la cirugía de reemplazo de válvulas. En los cultivos de tejidos de válvula aórtica se encontraron *P. acnes* 



**Figura 2.** Resultado positivo de la detección de ADN bacteriano mediante PCR en tejidos de las válvulas cardiacas V22 y V8, usando iniciadores ubicuos

(12 %), bacilos entéricos Gram negativos (8 %), Parabacteroides merdae (4 %) y C. bifermentans (4 %). En los tejidos de válvula mitral se hallaron P. acnes y C. beijerinckii solo en dos pacientes.

Propionibacterium acnes es una bacteria pleomorfa, anaerobia, Gram positiva, que forma parte de la microbiota de la cavidad oral, el intestino, la conjuntiva, el conducto auricular externo y la piel (35-37). La colonización de este microorganismo en tejidos valvulares puede ocurrir durante procedimientos quirúrgicos que facilitan la diseminación desde la piel (38). Esta bacteria tiene la habilidad de formar biopelículas, lo que aumenta su resistencia a diferentes tipos de antimicrobianos, incluso aquellos que se administran antes del procedimiento quirúrgico (39). El hallazgo de este microrganismo en los cultivos de las muestras de válvulas de los participantes en el estudio, bien puede asociarse a su migración mediante los mecanismos mencionados anteriormente, o bien por la contaminación durante la intervención quirúrgica o después de ella. Debe tenerse en cuenta que la endocarditis infecciosa no siempre es la causa de la insuficiencia valvular.

Clostridium bifermentans es un microorganismo que hace parte de la flora intestinal (40), al igual que los bacilos entéricos Gram negativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Se encuentran en todo el tubo digestivo, incluida la cavidad oral de pacientes con periodontitis (22-24), y su colonización posiblemente se facilita por el uso de antimicrobianos locales o sistémicos que alteran la microflora oral. Esto complica el tratamiento, ya que son muy resistentes a los antibióticos utilizados en el tratamiento convencional, además de propiciar las complicaciones sistémicas por su capacidad de entrar en el torrente sanguíneo y migrar a otros tejidos (41).

Su hallazgo en el surco gingival (36,7 %) y en las válvulas (8 %) de los sujetos participantes en este estudio, sugeriría una posible diseminación al endocardio, sobre todo teniendo en cuenta que las muestras orales de los sujetos cuyas válvulas resultaron positivas también fueron positivas para estos bacilos. Sin embargo, es necesario hacer estudios filogenéticos que permitan identificar si estas bacterias están relacionadas y, así, confirmar la hipótesis.

Parabacteroides merdae y C. beijerinckii son bacterias anaerobias aisladas más frecuentemente de heridas contaminadas (42-44) y su hallazgo en las muestras podría deberse a contaminación secundaria.

El tejido de las válvulas también se analizó mediante PCR convencional y no se encontró ADN de bacterias periodontales patógenas, aunque sí se detectó ADN bacteriano en dos de las muestras, lo que podría contradecir los resultados obtenidos en cultivo y en las pruebas moleculares de detección de organismos periodontales patógenos a partir de explantes de ateromas y válvulas cardiacas reportados por Nakano, *et al.* (30), en Japón en el 2016.

Estos autores detectaron ADN de dichos organismos en 35 válvulas cardiacas mediante análisis de secuenciación (34) y en 2007 detectaron ADN de *A. actinomycetemcomitans* en tejido valvular mediante PCR convencional (33); en tanto que en 2009 detectaron ADN de estreptococos orales, de *A. actinomycetemcomitans* y de otros microorganismos periodontales patógenos, como *P. gingivalis*, *P. intermedia/nigrescens*, *T. denticola*, *Tannerella forsithya* y *C. rectus*, en bajas proporciones utilizando también PCR convencional (30).

Sin embargo, otros autores como Cairo, *et al.*, reportaron resultados negativos en la detección del ADN de bacterias periodontales mediante PCR, a pesar de que los pacientes presentaban enfermedad periodontal (45). Radwan, *et al.*, por su parte, evaluaron mediante PCR convencional la capacidad de *P. gingivalis* para colonizar válvulas cardiacas en una muestra de 30 sujetos con enfermedad periodontal, en 15 de los cuales se detectó ADN de *P. gingivalis* en bolsas periodontales, pero no en el tejido valvular analizado (46).

Es importante tener en cuenta que la extracción del ADN bacteriano de tejidos es compleja, y que los métodos utilizados para la detección de los microorganismos pueden no ser lo suficientemente sensibles, aunque en el caso de este estudio se constató la veracidad de los resultados y hubo un seguimiento riguroso de la metodología con sus respectivos controles, según se describe en la sección de resultados. La manipulación de la muestra fue supremamente cuidadosa y se mantuvieron las condiciones de esterilidad desde la salida del quirófano hasta el laboratorio. Si bien es cierto que la detección de patógenos en el tejido valvular mediante cultivo microbiológico puede atribuirse a contaminación secundaria, la detección del ADN bacteriano mediante PCR también resultó positiva, lo cual puede deberse a limitaciones de la prueba o de los métodos de extracción del ADN en términos de sensibilidad analítica.

Se recomienda, para futuros estudios, hacer un análisis completo de secuenciación en el tejido de las válvulas o un análisis del metagenoma, con el fin de determinar la presencia o ausencia de ADN bacteriano. Las pruebas filogenéticas para determinar si los patógenos encontrados en las bolsas subgingivales se correlacionan con aquellos aislados de válvulas cardiacas, también pueden ser de utilidad para determinar su posible migración a los tejidos cardiovasculares desde la cavidad oral. Estos estudios aportarían mucho desde el punto de vista clínico, va que permitirían evaluar la eficacia de los protocolos farmacológicos en los pacientes sometidos a cirugías de reemplazo valvular, así como el cumplimiento riguroso de protocolos de profilaxis antibiótica y de desinfección por parte de odontólogos y periodoncistas en pacientes con antecedentes o factores de riesgo cardiovascular.

En conclusión, la microbiota periodontal de los pacientes sometidos a cirugía de reemplazo valvular que conformaron la muestra de este estudio, estaba conformada por especies Gram negativas organizadas en biopelículas, las cuales inducen estados proinflamatorios y tienen efecto en la condición cardiovascular. Aunque dichas especies, además, tienen la capacidad de migrar a tejidos extraorales, los resultados no evidenciaron una asociación entre los microorganismos periodontales patógenos y el desarrollo de enfermedad valvular; y, si bien algunos cultivos de tejido valvular y de muestras subgingivales fueron positivos para bacilos entéricos Gram-negativos, no es posible asegurar que correspondían a la misma especie u origen filogenético.

Existe la probabilidad de que la presencia de otros microorganismos, como *P. acnés*, *P. merdae*, *C. beijerinckii* y *C. bifermentans*, se deba a la contaminación en el proceso de extracción y manipulación

de las muestras durante los procedimientos quirúrgicos. Se requieren más estudios que permitan confirmar el papel de este tipo de microrganismos en la enfermedad valvular.

#### Agradecimientos

Al Programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores "Virginia Gutiérrez de Pineda" del Instituto de Ciencia y Tecnología de Colombia, Colciencias, y a la Universidad del Valle.

#### Financiación

Esta investigación fue financiada por la Convocatoria Interna "Capital Semilla 2014" de la Pontifica Universidad Javeriana de Cali.

#### Conflicto de intereses

Los autores no reportan conflicto de intereses.

#### Referencias

- Darveau R. Periodontitis: A polymicrobial disruption of host homeostasis. Nat Rev Microbiol. 2010;8:481-90. https://doi. org/10.1038/nrmicro2337
- Zijnge V, van Leeuwen B, Degener J, Abbas F, Thurnheer T, Gmur R, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. Plos One. 2012;5:9321. https://doi.org/10.1371/journal.pone. 0009321
- Socransky SS, Hafajee AD. Dental biofilms: Difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002;28:12-55. https://doi. org/10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x
- Desvarieux M, Demmer R, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs D, Papapanou S, et al. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness. Circulation. 2005;111:576-82. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000154582.37101.15
- Demmer R, Desvarieux M. Periodontal infections and cardiovascular disease: The heart of the matter. J Am Dent Assoc. 2006;137:S14-20. https://doi.org/10.14219/jada. archive.2006.0402
- Parkar SM, Modi GN, Jani J. Periodontitis as risk factor for acute myocardial infarction: A case control study. Heart Views. 2013;14:5-11. https://doi.org/10.4103/1995-705X.107113
- Nonnenmacher C, Stelzel M, Susin C, Jacovi L. Periodontal microbiota in patients with coronary artery disease measured by real-time polymerase chain reaction: A case-control study. J Periodontol. 2012;78:1724-30. https://doi.org/10.1902/jop.2007.060345
- Gaetti-Jardim E, Marcelino S, Feitosa A, Romito G, Ávila-Campos M. Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries. J Med Microbiol. 2009;58:1568-75. https://doi.org/10.1099/ jmm.0.013383-0
- Kozarov E. Bacterial invasion of vascular cell types: Vascular infectology and atherogenesis. Future Cardiol. 2012;8:123-38.https://doi.org/10.2217/fca.11.75
- Belstrom D, Holmstrup P, Damgaard C, Borch T, Skjodt M, Bendtzen K, et al. The atherogenic bacterium

- Porphyromonas gingivalis evades circulating phagocytes by adhering to erythrocytes. Infect Immun. 2011;79:1559-65. https://doi.org/10.1128/IAI.01036-10
- Rafferty B, Jönsson D, Kalachikov S, Demmer RT, Nowygrod R, Elkind MS, et al. Impact of monocytic cells on recovery of uncultivable bacteria from atherosclerotic lesions. J Intern Med. 2011;270:273-80. https://doi.org/10. 1111/j.1365-2796.2011.02373.x
- Costalonga M, Herzberg M. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. Immunol Lett. 2014;162:22-38. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014. 08.017
- Hajishengallis G. Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. Nat Rev Immunol. 2015;15:30-44. https://doi.org/10.1038/nri3785
- Loos B. Systemic markers of inflammation in periodontitis.
   J Periodontol. 2005;76:2106-15. https://doi.org/10.1902/jop. 2005.76.11-S.2106
- Premoli G, Villareal J, González A. Proteína C reactiva y su relación con la enfermedad periodontal y aterosclerosis. Acta Odontológica Venezolana. 2008;46:1-12.
- Thakare K, Deo V, Bhongade M. Evaluation of the C-reactive protein serum levels in periodontitis patients with or without atherosclerosis. Indian J Dent Res. 2010;21:326-9. https:// doi.org/10.4103/0970-9290.70787
- Persson GR, Persson RE. Cardiovascular disease and periodontitis: An update on the associations and risk. J Clin Periodontol. 2008;35:362-79. https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01281.x
- Ramírez J. ¿Es la enfermedad periodontal un factor de riesgo cardiovascular? Revisión de la evidencia experimental y clínica. Rev Estomatol. 2005;2:18-26.
- Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. Periodontol 2000. 2004;34:9-21. https://doi.org/10.1046/j.0906-6713.2002.003421.x
- Jaramillo A, Betancourth M, Mayorga-Fayad I, Castillo D, Aya M, Lafaurie G, etal. Perfiles antimicrobianos de bacterias subgingivales en pacientes con periodontitis en Colombia. Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral. 2008;1:61-5. https://doi.org/10.1016/S0718-5391(08)70010-7
- Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol. 1996;11:266-73. https:// doi.org/10.1111/j.1399-302X.1996.tb00180.x
- Contreras A, Moreno S, Jaramillo A, Peláez M, Duque A, Botero JE, et al. Periodontal microbiology in Latin America. Periodontology. 2000. 2015;67:58-86. https://doi.org/10.1111/prd.12074
- Lafaurie G, Contreras A, Barón A, Botero J, Mayorga I, Jaramillo A, et al. Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: A multicenter study. J Periodontol. 2007;78:629-39. https://doi.org/10.1902/jop.2007.060187
- 24. Mayorga-Fayad I, Lafaurie GI, Contreras A, Castillo DM, Barón A, Aya M del R. Microflora subgingival en periodontitis crónica y agresiva en Bogotá, Colombia: un acercamiento epidemiológico. Biomédica. 2007;27:21-33. https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.230

- Botero JE, Contreras A, Lafaurie G, Jaramillo A, Betancourt M, Arce RM. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. J Periodontol. 2007;78:696-704. https://doi.org/10.1902/jop. 2007.060129
- Chapple ILC, Genco R. Diabetes and periodontal diseases: Consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. J Clin Periodontol. 2013;40:106-12. https://doi.org/10.1111/jcpe.12077
- Borgnakke WS, Ylostalo PV, Taylor GW, Genco RJ. Effect of periodontal disease on diabetes: Systematic review of epidemiologic observational evidence. J Clin Periodontol. 2013;40:135-52. https://doi.org/10.1111/jcpe.12080
- Angeli F, Verdecchia P, Pellegrino C, Pellegrino RG, Pellegrino G, Prosciutti L, et al. Association between periodontal disease and left ventricle mass in essential hypertension. Hypertension. 2003;41:488-92. https://doi. org/10.1161/01.HYP.0000056525.17476.D7
- Reyes L, Herrera D, Kozarov E, Roldán S, Progulske-Fox A. Periodontal bacterial invasion and infection: Contribution to atherosclerotic pathology. J Clin Periodontol. 2013;40:30-50. https://doi.org/10.1902/jop.2013.1340012
- Nakano K, Nemoto H, Nomura R, Inaba H, Yoshioka H, Taniguchi K, et al. Detection of oral bacteria in cardio-vascular specimens. Oral Microbiol Immunol. 2009:24:64-8. https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2008.00479.x
- Kozarov E, Sweier D, Shelburne CH, Progulske-Fox A, Lopatin D. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. Microbes Infect. 2006;8:687-93. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.09.004
- Rafferty B, Dolgilevich S, Kalachikov S, Morozova I, Ju J, Whittier S, et al. Cultivation of Enterobacter hormaechei from human atherosclerotic tissue. J Atheroscler Thromb. 2011;18:72-81. https://doi.org/10.5551/jat.5207
- Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Tamura K, Miyamoto E, et al. Detection and serotype distribution of Actinobacillus actinomycetemcomitans in cardiovascular specimens from Japanese patients. Oral Microbiol Immunol. 2007:22:136-9. https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007. 00332.x
- 34. Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H, et al. Detection of cariogenic Streptococcus mutans in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. J Clin Microbiol. 2006;44:3313-7. https://doi.org/10.1128/JCM.00377-06
- Perry AL, Lambert PA. Propionibacterium acnes. Lett Appl Microbiol. 2006;42:185-8. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01866.x

- Caballero J, Arana R, Calle G, Caballero FJ, Sancho M, Piñero C, et al. Endocarditis aguda sobre válvula aórtica nativa por *Propionibacterium acnes*. Rev Esp Cardiol. 1997:50:906-8.
- Hinestrosa F, Djurkovic S, Bourbeau P, Foltzer M. Propionibacterium acnes as a cause of prosthetic valve aortic root abscess. J Clin Microbiol. 2007;45:259-61. https://doi.org/10.1128/JCM.01598-06
- 38. Delahaye F, Fol S, Célard M, Vandenesch F, Beaune J, Bozio A, et al. Propionibacterium acnes infective endocarditis. Study of 11 cases and review of literature. Arch Mal Coeur Vaiss. 2005;98:1212-8.
- 39. Kurz M, Kaufmann B, Baddour L, Widmer A. *Propionibacterium acnes* prosthetic valve endocarditis with abscess formation: A case report. BMC Infect Dis. 2014;14:105. https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-105
- Scanlan D, Smith M, Isenberg H, Engrassia S, Hilton E. Clostridium bifermentans bacteremia with metastatic osteomyelitis. J Clin Microbiol. 1994;32:2867-8.
- Ardila-Medina CM, Alzate-Vega J, Guzmán-Zuluaga IC. Correlación de bacilos entéricos Gram-negativos con parámetros clínicos y demográficos de pacientes con periodontitis crónica. Av Periodon Implantol. 2014;2677-82.
- Sakamoto M, Benno Y. Reclassification of Bacteroides distasonis, Bacteroides goldsteinii and Bacteroides merdae as Parabacteroides distasonis gen. nov., comb. nov., Parabacteroides goldsteinii comb. nov. and Parabacteroides merdae comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56:1599-605. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64192-0
- Johnson J, Moore W, Moore L. Bacteroides caccae sp. nov., Bacteroides merdae sp. nov., and Bacteroides stercoris sp. nov. isolated from human feces. Int J Syst Bacteriol. 1986; 36:499-501. https://doi.org/10.1099/00207713-36-4-499
- 44. Ezeji T, Qureshi N, Blaschek HP. Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping. World J Microbiol Biotechnol. 2003;19:595-603. https://doi.org/10.1023/A: 1025103011923
- 45. Cairo F, Gaeta C, Dorigo W, Oggioni MR, Pratesi C, Pini Prato GP, et al. Periodontal pathogens in atheromatous plaques. A controlled clinical and laboratory trial. J Periodontal Res. 2004;39:442-6. https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00761.x
- Radwan M, Jaworski A, Duś I, Plonek T, Szulc M, Kustrzycki W. Porphyromonas gingivalis in periodontal pockets and heart valves. Virulence. 2014;5:575-80. https:// doi.org/10.4161/viru.28657

#### ARTÍCULO ORIGINAL

### Cómo intervenir y prevenir el retraso del crecimiento en niños menores de cinco años de hogares incluidos en el Sisbén de Caldas

María Victoria Benjumea<sup>1</sup>, José Hernán Parra<sup>2</sup>, Juan Felipe Jaramillo<sup>3</sup>

- <sup>1</sup> Grupo Materno-Perinatal de Caldas, Departamento Básico Clínico, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia
- <sup>2</sup> Departamento de Matemáticas y Estadística, Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia
- <sup>3</sup> Secretaría de Planeación, Gobernación de Caldas, Manizales, Colombia

**Introducción.** El retraso del crecimiento o la desnutrición crónica (baja estatura para la edad) indica un fracaso en el logro del potencial genético con el que nacemos.

**Objetivo.** Estimar modelos predictivos de retraso del crecimiento en hogares con menores de cinco años en el departamento de Caldas, inscritos en el Sistema de Identificación de Potenciales Beneficiarios de Programas Sociales (Sisbén).

**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio analítico en todos los hogares (N=56.987) incluidos en la base de datos del Sisbén III con presencia de menores de cinco años (N=33.244). Las variables estudiadas fueron las características demográficas y socioeconómicas, el acceso a la salud, la vivienda, la pobreza, la educación, el mercado laboral y el retraso del crecimiento. El análisis multivariado se realizó en dos fases: en la primera, se llevó a cabo un análisis exploratorio en los hogares mediante un análisis de clasificación jerárquica (conglomerado) y, luego, se estimó un modelo no lineal predictivo (*probit*) con el retraso del crecimiento como variable dependiente.

**Resultados.** La mayor proporción de retraso del crecimiento en los menores de cinco años se encontró en la subregión Centro Sur, en la cabecera municipal y en los hogares con ingresos menores de USD\$ 65 mensuales.

**Conclusión.** La pobreza de los hogares caldenses con jefatura femenina en los que viven los menores de cinco años inscritos en el Sisbén, es el mayor predictor de su retraso en el crecimiento.

Palabras clave: desnutrición; trastornos de la nutrición del niño; pobreza; vivienda; composición familiar; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3307

#### How to intervene and prevent stunting of children from homes belonging to the Sisbén in Caldas

**Introduction:** Growth retardation or chronic malnutrition (low height for age) indicates a failure in the natural genetic potential that allows us to growth.

**Objective:** To estimate predictive models of growth retardation in households with children younger than five years in the department of Caldas and registered in the identification system of potential beneficiaries of social programs (*Sistema de Identificación de Potenciales Beneficiarios de Programas Sociales, Sisbén*).

**Materials and methods:** We conducted an analytical study in all households (N=56,987) included in the Sisbén III database with the presence of children younger than five years (N=33,244). The variables under study were demographic and socioeconomic characteristics, health service access, housing, poverty, education, job market, and growth retardation. The multivariate analysis was done in two phases: first, an exploratory analysis of households using hierarchical classification (cluster), then estimation of a nonlinear predictive model (probit) with growth retardation as the dependent variable.

**Results.** The largest proportion of growth retardation in children younger than five years was found in southcentral Caldas, in urban centers, and households with monthly income lower than USD\$ 65.

**Conclusion.** Poverty in Caldas women-headed households with children younger than five years registered in the Sisbén was the main predictor of growth retardation.

**Key words:** Malnutrition; child nutrition disorders; poverty; housing; family characteristics, Colombia. doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3307

#### Contribución de los autores:

Todos los autores participaron en la selección, depuración y validación de las bases de datos; en la interpretación y análisis de los datos; en la presentación de los resultados; en la discusión y verificación de las referencias bibliográficas, y en la escritura del manuscrito.

El retraso en el crecimiento o la desnutrición crónica (baja estatura para la edad) indican un fracaso en el logro del potencial genético con el que nacemos (1,2), y se debe a infecciones frecuentes y tempranas en la vida, al destete temprano (antes de los seis meses de vida) o a una alimentación inadecuada para permitir el rápido crecimiento y el desarrollo de los niños pequeños durante los primeros 1.000 días de vida entre el embarazo y el segundo año de edad (3).

La manifestación física del retraso en el crecimiento es el producto nefasto e irreversible de la privación nutricional crónica temprana, y se manifiesta por alteraciones del desarrollo neurológico, deterioro cognitivo permanente, sistema inmunitario debilitado, y propensión a enfermedades crónicas, como la diabetes, las enfermedades del corazón y ciertos tipos de cáncer en la edad adulta. Las investigaciones muestran que el daño causado por este déficit nutricional en el desarrollo del niño puede resultar en bajo coeficiente intelectual, en bajas tasas de finalización de la vida escolar, y en bajo rendimiento educativo y laboral. A nivel macroeconómico, este puede costarles a los países hasta 11 % de su producto interno bruto en términos de salarios más bajos y de pérdida de productividad (3,4).

El retraso del crecimiento en una pareja genera hijos con desnutrición crónica, lo cual perpetúa la pobreza intergeneracional. Los niños nacidos de mujeres con este problema tienen mayores probabilidades de tener un crecimiento deficiente. Así, la baja estatura para la edad refleja los efectos persistentes y acumulados de la mala nutrición y de otros déficits que se extienden a lo largo de varias generaciones (5-9).

El retraso en el crecimiento es tan omnipresente como persistente. A nivel mundial, uno de cada cuatro niños menores de cinco años sufre de retraso en su crecimiento. Curiosamente, sin embargo, la mayoría (70 %) de los 165 millones de estos niños en el mundo viven en países de ingresos medios (10). Como indicador de desarrollo, proporciona una medida clara del nivel de desigualdad presente en una sociedad con desventajas para los más vulnerables y marginados, y en formas que la

Correspondencia:

María Victoria Benjumea, Calle 38 B Sur N° 26-02, apartamento 806, torre 2, urbanización Montevento, Envigado, Colombia Teléfono: (310) 432 7947

benjumear@yahoo.com.ar

Recibido: 18/04/16; aceptado: 28/02/17

medición tradicional de la pobreza por ingresos o el índice de pobreza multidimensional (que es como se mide en Colombia) no lo detectan (11).

El uso del indicador de talla para la edad, o de retraso en el crecimiento, como una forma de medir la pobreza, es particularmente poderoso, pues pone en evidencia la necesidad de abordarlo mediante acciones intersectoriales y un enfoque de sistemas (sistemas de seguridad alimentaria y nutricional, por ejemplo, de salud, agua y saneamiento, y de protección social), así como atendiendo a la situación general de la mujer en la sociedad (12).

Por esta razón, el retraso en el crecimiento ha ido ganando mayor aceptación como un indicador de la agenda mundial de desarrollo a partir del 2015 y en el marco de las nuevas metas globales de desarrollo para el 2030. La baja estatura para la edad es el resultado de muchos factores, algunos directos, como la mala alimentación, pero muchos indirectos, como la mala salud, la falta de educación de la madre (la cual contribuye a la mala alimentación de la familia, a los bajos ingresos, y a la mala salud), el acceso al agua y el saneamiento (cuya ausencia contribuye a la mala salud), el corto intervalo entre los nacimientos y el alto número de partos, así como la pobreza en general (13). Por lo tanto, la reducción del retraso en el crecimiento requiere de una respuesta multisectorial dirigida a los más pobres y vulnerables, y planeada, en lo posible, localmente y a largo plazo (14).

El uso del retraso del crecimiento como el indicador más importante de desarrollo local y departamental, permite un acercamiento para acabar con la pobreza extrema que se centra en los más vulnerables y marginados, y ayuda a asegurar el acceso equitativo a una mayor y mejor alimentación, a los servicios de salud, al agua y el saneamiento, y a otras necesidades básicas; además, promueve la acción y el avance en una serie de campos: la seguridad alimentaria y la agricultura, la salud, la educación, el desarrollo infantil temprano, la igualdad de género y el crecimiento económico, contribuyendo a medir el bienestar físico y el desarrollo de las personas (13).

Entre 1990 y 2010, Colombia mejoró sustancialmente el control de la desnutrición crónica o el retraso en el crecimiento (26,1 a 13,2 %) (15), aunque sin lograr la meta establecida en los objetivos de desarrollo del milenio de llegar a 8 % (16). En este sentido, el departamento de Caldas no se comporta como el resto del país, pues las

cifras de desnutrición crónica aumentan progresivamente (de 13,5 a 14,15 %) (17) y superan las del país (Caldas: 14,15 % Vs. Colombia: 13,2 %) (15,16).

Las intervenciones tradicionales de entrega de alimentos a las madres gestantes y de complementación alimentaria a los niños, no han mostrado ser efectivas para controlar la desnutrición crónica en Caldas, como lo demuestran las cifras (17,18).

Con el objetivo de orientar a los nuevos dirigentes del departamento y a los líderes comunitarios, el Grupo de Investigación Materno-Perinatal de Caldas se propuso analizar en cada municipio el comportamiento de la desnutrición crónica en los menores de cinco años de todos los hogares de estratos 1 a 3 del Sistema de Identificación de Potenciales Beneficiarios de Programas Sociales (Sisbén), para determinar los factores que pueden contribuir al control y la prevención del retraso en el crecimiento, y al diseño de intervenciones intersectoriales eficaces y focalizadas en cada municipio caldense.

#### Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio analítico en el 100 % de los hogares clasificados en la base de datos del Sisbén, versión III, actualizada por la Secretaría de Planeación Departamental hasta abril de 2015, sin incluir la población indígena, (metodología vigente en Colombia para priorizar a la población vulnerable), y con presencia de menores de cinco años inscritos en este sistema de beneficiarios.

El total de personas estudiadas fue de 274.663 (43%) residentes en 56.987 hogares con menores de cinco años (N=33.244), correspondientes al 30 % de los hogares registrados en esta base de datos.

Las variables estudiadas en los hogares del Sisbén fueron las características demográficas y socioeconómicas, el acceso a la salud, la vivienda, la pobreza, la educación, el mercado laboral, en tanto que el retraso en el crecimiento o la baja talla para la edad se establecieron como la variable dependiente.

#### Técnicas y procedimientos

La base de datos del Sisbén, con 639.484 personas, se filtró para seleccionar solo a los hogares con presencia de menores de cinco años. Dicha base se complementó con datos y variables de otros dos estudios realizados en el departamento de Caldas; el primero, ejecutado en el 2014 por la Universidad Nacional de Colombia y la Dirección Territorial de Salud, sobre el estado nutricional de la población

caldense (17), y el segundo, el estudio de línea de base para la reducción de la pobreza en el departamento de Caldas del Programa Mundial de Alimentos en el 2010 (19). A partir de estas variables, se codificaron de nuevo las variables requeridas para el análisis.

El análisis antropométrico de la talla para la edad de los menores de cinco años para estimar el puntaje Z≤2 (establecido como punto de corte por el Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia), se llevó a cabo con el programa Anthro, versión 3.2.2, de la Organización Mundial de la Salud (20).

Los datos originales de talla se obtuvieron de la base de datos del estudio de línea de base para la reducción de la pobreza en el departamento de Caldas, del Programa Mundial de Alimentos en el 2010 (19). La clasificación del puntaje del Sisbén III en cada hogar se llevó a cabo según lo propuesto en la Resolución 3778 de agosto 30 de 2011 (21) y luego se codificó para el diseño de los conglomerados.

El método usado para la combinación de las diferentes bases de datos fue el de apareamiento por puntaje de propensión (*propensity score matching*), el cual, según Bernal, *et al.* (22), asume que la selección en el programa se basa únicamente en características o variables observables.

#### Análisis de los datos

Las variables cualitativas se describieron de forma univariada mediante frecuencias relativas y absolutas. El análisis multivariado se llevó a cabo en dos etapas: la primera fue un análisis de clasificación jerárquica (conglomerado) y, la segunda, un modelo no lineal predictivo (*probit*).

En la primera fase, el análisis de conglomerados, se establecieron grupos de hogares que reunían unas características similares a las variables estudiadas. Para este fin, se usó el método jerárquico de conglomerado que supuso que cada hogar era un pequeño grupo por sí mismo que no cambiaba en todo el proceso de agrupación, hasta que solo permanecía un único grupo que contenía todas las observaciones. Inicialmente, se elaboró el dendrograma de clasificación para establecer el número de clases o conglomerados. El dendrograma es una representación gráfica o diagrama de datos en forma de árbol con el que se organizaron los datos en subcategorías que se fueron dividiendo en otras hasta llegar al nivel de detalle deseado (semejante a las ramas de un árbol que se van dividiendo sucesivamente en otras) (23,24).

En la segunda fase, la estimación del modelo no lineal predictivo (probit), se usó el retraso del crecimiento como variable dependiente. Esta variable tomó el valor de Y=1 en presencia de retraso del crecimiento y, de Y=0, en su ausencia. Las variables explicativas, o covariables, fueron las siguientes: "vivhacin", vivir en hacinamiento; "acueducto", contar con agua conectada al acueducto; "jefemujer", hogar con jefatura femenina; "ocuphog", jefe del hogar ocupado; "hdesemana", desempleo de larga duración de cualquiera de los miembros del hogar, y "dipm", pobreza según el índice de pobreza multidimensional. El modelo probit permitió calcular la probabilidad de que un menor de cinco años de estos hogares estuviera en riesgo de tener retraso en el crecimiento o no lo estuviera. La información se procesó los programas Stata® 13.1, Spad® 4.5 y SPSS®, versión 22.0.

#### Consideraciones éticas

En todos los casos se protegió la identidad de los individuos estudiados, pues la base de datos se limpió antes de acceder a ella para excluir la información personal (nombres, dirección y documentos de identificación), y se consideraron las exigencias del Ministerio de Salud para estudios en humanos consignadas en la Resolución N° 008430 de 1993 (25), además de considerar las particularidades del Decreto 4816 del 23 de diciembre de 2008 sobre los requisitos y condiciones para el uso de los datos del Sisbén (26).

#### Resultados

El retraso del crecimiento, o baja talla para la edad, de los menores de cinco años de hogares clasificados en el Sisbén (n=4.817) en las subregiones caldenses se presenta en la figura 1. La proporción más alta se encontró en la subregión centro-sur (46,9 %), seguida de la del Magdalena caldense (18,2 %) y la de bajo occidente (10,5 %). La distribución del retraso del crecimiento en los municipios se presenta en la figura 2. Los municipios con mayor prevalencia de retraso en el crecimiento fueron Marmato, San José y Risaralda.

Según el sexo, fue ligeramente superior, por 4,6 puntos porcentuales, en los varones (niños: 52,3 % *Vs.* niñas: 47,7 %). Según el lugar de residencia, este fue muy superior en la cabecera municipal y en más de uno de cada cinco niños en la zona rural dispersa del departamento (cabecera: 68,8 %, zona rural dispersa: 22,6 %, centro poblado: 8,6 %).

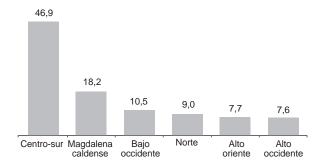
En cuanto a los ingresos reportados por el jefe del hogar, el retraso en el crecimiento solo se presentó en hogares con ingresos inferiores a COP\$ 200.000 mensuales (n=4.817) y, al clasificar los hogares según el índice de pobreza multidimensional, su proporción fue similar (pobre: 14,8 % *Vs.* no pobre: 14,2 %).

En la figura 3 se puede observar el desplazamiento hacia la izquierda de la talla para la edad de la población estudiada entre 0 y 4 años, con respecto al patrón de crecimiento establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS). El retraso en el crecimiento fue más notorio entre los menores de cinco años de sexo masculino (p<0.05).

Después de evaluar múltiples modelos de predicción del retraso del crecimiento en los hogares del Sisbén en Caldas, se encontró uno que cumplía con todos los requisitos metodológicos: supuestos de validación del modelo y estimadores estadísticamente significativos, es decir, menores de 5 % según el test de Wald (cuadro 1). Dicho modelo planteaba que los hogares pobres con jefatura femenina y con algún integrante desempleado de larga data, con hacinamiento y que no contaban con acueducto, eran los que mayor probabilidad tenían de que sus menores de cinco años presentaran retraso en el crecimiento.

Después de obtener el mejor modelo de predicción del retraso del crecimiento (cuadro 1), se procedió a buscar con el dendrograma los hogares con características que predijeran esta situación nutricional. Con este método, se encontró el número de clases de hogares, y se obtuvieron la partición y los indicadores de la homogeneidad de las clases obtenidas.

La partición del árbol en tres clases (figura 4) proporcionó grupos compuestos por 1.546 hogares en la clase 1, 2.003 hogares en la clase 2 y 1.268 hogares en la clase 3.



**Figura 1.** Distribución porcentual de los menores de cinco años con retraso del crecimiento por subregiones en Caldas (n=4.817)

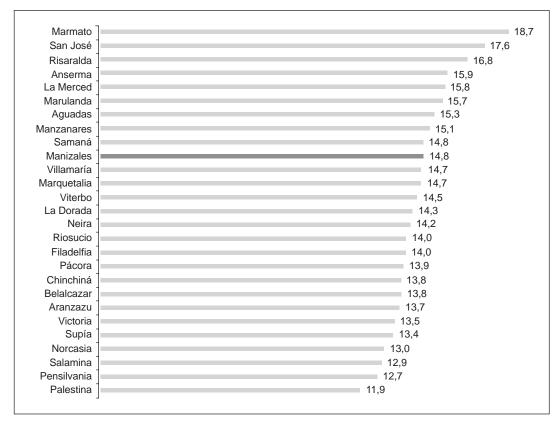
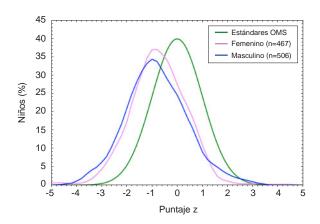


Figura 2. Distribución porcentual de los menores de cinco años con retraso del crecimiento por municipios, Caldas (n=4.817)



**Figura 3.** Retraso del crecimiento (talla para edad, puntaje  $Z \le 2$ ) por sexo, entre menores de cinco años de hogares inscritos en el Sisbén, Caldas, 2015

En el cuadro 2 se recogen las inercias de cada uno de los conglomerados y sus distancias hasta el centro de gravedad de la muestra, información que permitió ver el grado de dispersión de cada hogar con respecto al promedio general.

La clase más homogénea y con el menor número de hogares fue la 3 o de hogares muy críticos (inercia de 0,1604); la clase 1 o de hogares moderadamente críticos, fue la más heterogénea (inercia de 0,2025), y la clase más grande o con mayor número de hogares fue la clase 2 o de hogares críticos.

En el cuadro 3 se pueden observar las coordenadas de las clases sobre los ejes factoriales y sus valores según el test. Las clases se pueden interpretar al igual que la posición de los individuos (hogares) sobre el primer plano factorial. En la figura 5 se observa la concentración o dispersión de los hogares en las distintas clases.

Las tres clases resultantes del análisis de conglomerados jerárquicos se presentan en el cuadro 4. Se seleccionaron 35 variables de diversos sectores del desarrollo. En el cuadro 4 y la figura 5, se presentan las tres clases de hogares con menores de cinco años con retraso en el crecimiento, las categorías sobresalientes de las variables en cada clase, la proporción obtenida y su significación estadística.

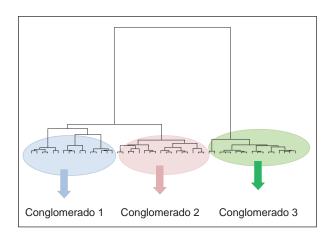
Como puede verse, las variables son de diversa índole y sector del desarrollo: algunas son de salud, otras de vivienda y de acceso a servicios públicos, y otras de educación y empleo; no obstante, en las

Cuadro 1. Modelo de predicción del retraso del crecimiento en los hogares inscritos en el Sisbén y con presencia de menores de cinco años

hdnt	dF/dx	Error estándar	z	P> z	x-bar	IC	95%
Vivhacin*	0,0282078	0,0063654	4,77	0,000	0,203403	0,015732	0,040684
Acueducto	-0,0174111	0,0061712	-2,82	0,005	1,188340	-0,029506	-0,005316
Jefemujer*	0,0202144	0,0047490	4,29	0,000	0,461622	0,010907	0,029522
Ocuphog	-0,0089449	0,0031963	-2,79	0,005	0,968936	-0,015210	-0,002680
Hdesemana*	0,0646936	0,0375635	2,11	0,034	0,005576	-0,008930	0,138317
Dipm*	0,0409592	0,0055194	7,74	0,000	0,379870	0,030141	0,051777
Obs. P	0,0786387	·			•		
Pred. P	0,0749762	(at x-bar)					

<sup>\*</sup> dF/dx representa los cambios discretos en la variable ficticia de 0 a 1

Vivhacin: vivir en hacinamiento; Acueduc: contar con agua conectada al acueducto; Jefemujer: hogar con jefatura femenina; Ocuphog: jefe del hogar ocupado; Hdesemana: desempleo de larga data de algún integrante del hogar; Dipm: pobreza según el índice de pobreza multidimensional



**Figura 4.** Dendrograma del análisis de conglomerados de los hogares del Sisbén con presencia de menores de cinco años con retraso del crecimiento en Caldas (n=4.817)

tres clases, el retraso del crecimiento se relacionó con la pobreza, ya sea clasificada por el índice de pobreza multidimensional o por el puntaje del Sisbén III.

Los hogares muy críticos, o de la clase 3, se ubicaban en el área rural dispersa de los municipios de Samaná, Manzanares, Pensilvania, Marquetalia, Anserma y Aguadas; tenían un puntaje en el Sisbén III entre 14,1 y 31,5, contaban con integrantes desempleados, entre otras carencias de bienes y servicios, y no disponían de agua proveniente del acueducto ni alcantarillado.

Los hogares críticos, o de la clase 2, se ubicaban en la cabecera de los municipios de Villamaría, Chinchiná y Palestina, compartían con los hogares anteriores el mismo puntaje del Sisbén III (14,1 y 31,5), tenían acceso al acueducto, y tenían menos carencias de bienes y servicios que los hogares muy críticos o de la clase 3.

Cuadro 2. Descomposición de la inercia por clases de hogares

	Inercias	Efectivos	Distancias
Interclases	0,3068		
Clase 1	0,2025	1 546	0,3052
Clase 2	0,1960	2 003	0,0968
Clase 3	0,1604	1 268	0,6405
Total	0,8340		

**Cuadro 3.** Coordenadas y valores test en los ejes factoriales por clases de hogares

Clases	Valore	es test	Coorde	enadas
	Eje 1	Eje2	Eje 1	Eje2
Clase 1	45,2	33,5	0,50	0,22
Clase 2	12,5	-49,1	0,11	-0,27
Clase 3	-61,9	19,5	-0,78	0,15

Los hogares moderadamente críticos o de la clase 1 se ubicaban en la cabecera de los municipios de Manizales y La Dorada, tenían un puntaje del Sisbén III superior al de los otros hogares, contaban con integrantes desempleados y tenían mejores condiciones de vivienda que los demás, con acceso a acueducto y alcantarillado.

Los integrantes de los hogares de las clases 2 y 3 se clasificaron como pobres después de aplicarles el índice de pobreza multidimensional, mientras que los de la clase 1, no. Estos mismos hogares carecían de nevera para almacenar y proteger sus alimentos. En los tres tipos de hogares hubo integrantes sin cobertura de servicios de salud.

#### Discusión

Para la comunidad, los responsables de las decisiones y los diseñadores de políticas públicas en Caldas, es útil la información obtenida en este

Z y P>|z| corresponden a un valor de 0 en la prueba del coeficiente subyacente

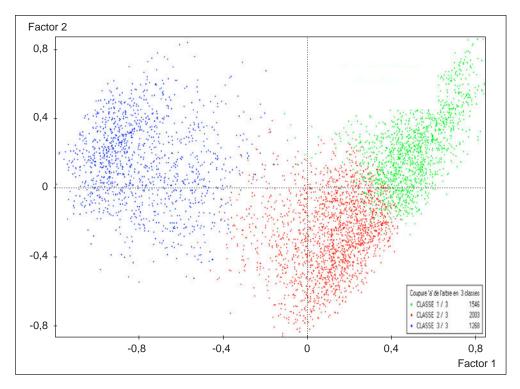


Figura 5. Visualización de las clases de hogares clasificados en el Sisbén con presencia de menores de cinco años con retraso del crecimiento en Caldas

estudio en la medida en que corresponde a cada municipio y permite determinar los hogares críticos y muy críticos que cumplen con los criterios para intervenciones integrales orientadas a prevenir el retraso en el crecimiento infantil. Además, el trabajo en equipo comunitario, multidisciplinario y multisectorial a nivel municipal y departamental, es necesario para abordar este problema nutricional como lo exige su complejidad y no solamente en el sector de la salud, pues ya se ha demostrado que no es suficiente atender con intervenciones sanitarias o alimentarias el comportamiento progresivo de la prevalencia de la desnutrición crónica y la mortalidad por esta causa en ciertas regiones de Colombia (27-31); se requiere la vinculación de los sectores de educación y vivienda, como mínimo.

Desde la década de los 90 del siglo pasado, han aparecido diversas publicaciones sobre la relación existente entre el retraso en el crecimiento y la pobreza (32). Las escuelas de formación en nutrición lo enfatizan y los economistas lo estudian y comprueban en las reuniones de consenso que se llevan a cabo en Copenhague (33) y en otras similares (27,34,35). No obstante, las intervenciones tradicionales para su control y reducción en Colombia y en Caldas no discriminan por estado nutricional y se basan, en su mayoría, en la entrega

de alimentos (36,37), lo cual trae como consecuencia, entre otros efectos, el sobrepeso en la población y la consecuente detención o desaceleración del crecimiento en talla (15,17,38), sobretodo en los más pobres (27,28,39-41).

Según el estudio de Paraje publicado por la CEPAL en el 2008 (42):

"[...] desde el punto de vista de las políticas públicas, las políticas sanitarias sólo pueden tener un éxito parcial para reducir esta condición si no son implementadas en conjunto con una serie de políticas adicionales (educativas, de vivienda, de ingresos) en un entorno macroeconómico estable. En países donde la desigualdad en la concentración en la distribución socioeconómica de esta variable es alta (como los latinoamericanos), la disminución de la desnutrición crónica infantil puede lograrse de manera más efectiva disminuyendo dicha desigualdad, la que tiene... fuertes condicionantes socioeconómicos (cuanto más concentrada esté la 'riqueza', más concentrada está la desnutrición crónica infantil entre hogares 'pobres') [...]".

En el modelo de predicción *probit* del retraso del crecimiento estimado en este estudio, no se establecieron variables de ingresos, gastos o acceso a programas de complementación alimentaria,

Cuadro 4. Clases de hogares clasificados en el Sisbén y con presencia de menores de cinco años con retraso del crecimiento, en Caldas (conglomerado)

Hogare	Hogares moderadamente críticos (Clase 1/3)	SO.		1		Hogares críticos (Clase 2/3)			ĺ	Hogar (	Hogares muy críticos (Clase 3/3)			
Variables	Categoría	%	Valor test	Prob	Variables	Categoría	%	Valor test	Prob	Variables	Categoría	%	Valor test	Prob
Personas de hogares pobres según IPM	No	8,68	40,83	0	Personas de hogares pobres según IPM	Ñ	63,9	15,2	0	Personas de hogares pobres según IPM	Š	80,2	24,93	0
Acceso a servicio	De uso exclusivo del hogar	0,76	21,71	0	Acceso a servicio sanitario por hogar	Compartido con otros hogares	31,9	22,2	0	Acceso a servicio sanitario			•	
Actividad en el último mes	Sin actividad	82,9	-10,41	0	Actividad en el último mes			٠		Actividad en el último mes	Sn actividad	97,2	11,21	0
Afiliación a salud (EPS)	Contributivo	25,7	21,27	0	Afiliación a salud (EPS)	Ninguna	63,7	8,5	0	Afiliación a salud (EPS)	Ninguna	50,2	-5,20	0
Características del servicio sanitario	Inodoro con conexión	0,66	33,16	0	Características del servicio sanitario	Inodoro con conexión	92,8	33,4	0	Características del servicio sanitario	Inodoro con conexión	47,6	39,51	0
El hogar cuenta con bienes raíces	OZ	0,73	-12,79	0	El hogar cuenta con bienes raíces	° N	7,18	15,8	0	El hogar cuenta con bienes raíces	o N	65,5	-3,54	0
El hogar cuenta con equipo de sonido	OZ	51,0	-25,50	0	El hogar cuenta con equipo de sonido	o Z	85,5	14,7	0	El hogar cuenta con equipo de sonido	oN	87,0	12,16	0
El hogar cuenta con lavadora	o Z	6'89	-32,14	0	El hogar cuenta con lavadora	o Z	2'96	19,8	0	El hogar cuenta con lavadora	oN	2,96	16,01	0
El hogar cuenta con nevera o enfriador	Sí	1,18	34,55	0	El hogar cuenta con nevera o enfriador	o Z	61,5	16,4	0	El hogar cuenta con nevera o enfriador	ON	67,8	16,79	0
El hogar cuenta con servicio de televisión por cable o parabólica	ଉ	84,2	37,37	0	El hogar cuenta con servicio de televisión por cable o parabólica	°Z	26,0	2,6	0,004	El hogar cuenta con servicio de televisión por cable o parabólica	S N	96,4	38,99	0
El hogar cuenta con televisor	S	6,76	24,64	0	El hogar cuenta con televisor	Ñ	7,97	-5,9	0	El hogar cuenta con televisor	Σĭ	64,1	-15,52	0
Está cubierto en salud	No	52,3	-3,99	0	Está cubierto en salud	No	63,7	8,5	0	Está cubierto en salud	<sub>N</sub>	50,2	-5,20	0
Estrato socioeconómico	2	53,1	2,90	0	Estrato socioeconómico	\ =>	49,7	6,3	0	Estrato socioeconómico	\ = -	50,5	7,15	0
Hogar: menor de 5 años sin salud	Š	55,4	-5,47	0	Hogar: menor de 5 años sin salud			•		Hogar: menor de 5 años sin salud	ଊ୕	55,8	-4,42	0
Dónde se encuentra el sanitario que usan las			•		Dónde se encuentra el sanitario que usan las	Fuera de la unidad	19,3	2,9	0,002	Dónde se encuentra el sanitario que usan las	Dentro del hogar	62,0	-19,33	0
personas en el nogar Hogares pobres	Hogar	14.6	5.97	0	personas en el nogar Hogares pobres	del nogar -				personas en el nogar Hogares pobres				
según IPM	no pobre	-	5	)	según IPM					según IPM				
La unidad de vivienda cuenta con el servicio público de acueducto	Ö	8,66	29,60	0	La unidad de vivienda cuenta con el servicio público de acueducto	ळ	0,66	32,9	0	La unidad de vivienda cuenta con el servicio público de acueducto	<u>8</u>	79,0	58,20	0
La unidad de vivienda cuenta con el servicio público de alcantarillado	ઝ	99,2	33,06	0	La unidad de vivienda cuenta con el servicio público de alcantarillado	ত	9,96	34,1	0	La unidad de vivienda cuenta con el servicio público de alcantarillado	o Z	96,5	66,80	0
La unidad de vivienda cuenta con el servicio público de gas	ଉ	71,9	4	0	La unidad de vivienda cuenta con el servicio público de gas	°Z	84,9	19,1	0	La unidad de vivienda cuenta con el servicio público de gas	o N	0,66	30,50	0
La unidad de vivienda cuenta con el servicio público de recolección de basuras	ö	6,66	32,55	0	La unidad de vivienda cuenta con el servicio público de recolección de basuras	Ö	97,5	33,1	0	La unidad de vivienda cuenta con el servicio público de recolección de basuras	ON.	88,7	62,60	0
La unidad de vivienda cuenta con el servicio público de teléfono	o <sub>N</sub>	70,3	-23,91	0	La unidad de vivienda cuenta con el servicio público de teléfono	°Z	93,1	10,3	0	La unidad de vivienda cuenta con el servicio público de teléfono	ON.	99,5	18,40	0
Lugar de residencia	Cabecera	2'96	32,19	0	Lugar de residencia	Cabecera	2'98	23,5	0	Lugar de residencia	Rural disperso	9,18	58,00	0
Material predominante de las paredes exteriores	Bloque, ladrillo, piedra, madera pulida	89,1	32,93	0	Material predominante de las paredes exteriores	Bloque, ladrillo, piedra, madera pulida	49,20	6°8	0	Material predominante de las paredes exteriores	Bahareque	36,1	10,0	0

Hogari	Hogares moderadamente críticos (Clase 1/3)	so				Hogares críticos (Clase 2/3)				Hoga	Hogares muy críticos (Clase 3/3)			
Variables	Categoría	%	Valor	Prob	Variables	Categoría	%	Valor	Prob	Variables	Categoría	%	Valor	Prob
Material predominante de los pisos	Baldosa, vinilo, tableta	45,3	26,68	0	Material predominante de los pisos	Madera burda, madera	36,30	0,6	0	Material predominante de los pisos	Cemento o gravilla	9'09	4,0	0
Muy pobre según puntaje Sisbén III <=32,98	Pobre	92,6	43,23	0	Muy pobre según puntaje Sisbén III <=32,98	Muy pobre	72,80	17,9	0	Muy pobre según puntaje Sisbén III <=32,98	Muy pobre	87,3	26,1	0
Municipio	Manizales	53,8	24,12	0	Municipio	Villamaría	10,30	10,5	0	Municipio	Samaná	7,7	10,6	0
Municipio	La Dorada	24,9	16,51	0	Municipio	Chinchiná	9,80	8,3	0	Municipio	Manzanares	7,3	10,3	0
Municipio					Municipio	Palestina	4,10	7,4	0	Municipio	Pensilvania	6,2	8,9	0
Municipio					Municipio					Municipio	Marquetalia	5,4	8,4	0
Municipio					Municipio					Municipio	Anserma	8,8	9,9	0
Municipio					Municipio					Municipio	Aguadas	6,5	0,9	0
Subregión					Municipio					Subregión	Alto oriente	19,4	16,7	0
Subregión	Centro sur	63,2	15,58	0	Subregión	Centro sur	54,00	8,3	0	Subregión	Norte	17,4	11,3	0
Subregión	Magdalena caldense	25,9	9,32	0	Subregión					Subregión	Bajo occidente	18,1	2,6	0
Origen del agua para consumo del hogar	Acueducto	8'66	29,90	0	Origen del agua para consumo del hogar	Acueducto	98,70	32,7	0	Origen del agua para consumo del hogar	Río, quebrada, manantial	73,9	6,53	0
Puntaje del Sisbén III (agrupado)	Entre 31,6 y 50,0	41,0	12,70	0	Puntaje del Sisbén III (agrupado)	Entre 14,1 y 31,5	59,16	18,1	0	Puntaje del Sisbén III (agrupado)	Entre 14,1 y 31,5	2'69	13,3	0
Qué tipo de combustible o fuente de energía utilizan principalmente	Gas natural domiciliario	70,2	44,50	0	Qué tipo de combustible o fuente de energía utilizan principalmente	Gas propano (en cilindro)	72,69	35,1	0	Qué tipo de combustible o fuente de energía	٠,	1	1	•
Tenencia de vivienda	Arriendo	51,4	7,40	0	Tenencia de vivienda	Arriendo	60,01	19,4	0	Tenencia de vivienda	Otra condición	59,5	28,4	0
Tiene ducha o regadera conectada al acueducto	Θί	2,96	27,50	0	Tiene ducha o regadera conectada al acueducto	Ñ	93,56	27,6	0	Tiene ducha o regadera conectada al acueducto	°Z	83,8	54,3	0
Tipo de establecimiento educativo	Ninguno	82,9	-10,40	0	Tipo de establecimiento educativo					Tipo de establecimiento educativo	Ninguno	97,4	11,7	0
Privación eliminación excretas					Privación eliminación excretas	°N	96,56	34,1	0	Privación eliminación excretas	Σί	96,5	8,99	0
Privación hacinamiento	1				Privación hacinamiento	Ω	66,40	16,4	0	Privación hacinamiento	o N	51,7	3,4	0
Qué tipo de combustible o fuente de energía utilizan principalmente para cocinar			· ·	•	Qué tipo de combustible o fuente de energía utilizan principalmente para cocinar	Material de desecho,	60'6	-22,7	0	Qué tipo de combustible o fuente de energía utilizan principalmente para cocinar	Material de desecho	7'08	52,1	0

IPM: índice de pobreza multidimensional; EPS: entidad prestadora de servicios de salud; Sisbén: sistema de identificación de potenciales beneficiarios de programas sociales; Prob: probabilidad

sino variables relacionadas con las condiciones medioambientales del hogar, las características de la vivienda, sus condiciones de habitabilidad, el sexo de la persona jefe del hogar, y el desempleo y la pobreza, tal como las descritas por Paraje (42) y otros autores (35,43). Estas variables pueden tener un impacto directo sobre el retraso en el crecimiento y sobre su distribución. Según Paraje (42), una meior distribución de la riqueza no implica necesariamente quitarle recursos a un grupo para dárselos a otro sino, por ejemplo, mejorar el acceso al agua potable y el saneamiento adecuado para los hogares que no lo tienen. Naturalmente, este tipo de políticas puede tener un efecto redistributivo dependiendo de la progresividad de la estructura tributaria. De igual manera, las políticas de vivienda que meioren la situación habitacional de los grupos menos aventajados pueden contribuir a una reducción de la desnutrición crónica infantil (42).

El nivel educacional de los padres, y especialmente el de la madre (43), es otra variable que influye decisivamente en el nivel y la distribución de la desnutrición crónica, tal como se comprobó en este estudio en las mujeres jefe de hogar. No obstante, para que las mejoras en la educación tengan un efecto pleno sobre la desnutrición, deben beneficiar principalmente a los hogares más pobres y concentrarse primordialmente en el nivel básico de educación (42). Es importante destacar que, en la población del Sisbén en Caldas, se determinó que el analfabetismo funcional era de 21,0 % y el promedio de años de estudio entre las mujeres cabeza de hogar era de cinco años. Mediante el dendrograma, se detectaron los municipios y el lugar de residencia de los integrantes de hogares críticos y muy críticos, con lo cual se facilitan las intervenciones. Dado que, sistemáticamente, dichos hogares perciben menos ingresos y tienen menos acceso a la educación, al agua potable y al saneamiento, entre otros, deben ser el núcleo de los programas municipales destinados a reducir la brecha entre estos hogares y el resto (44-47).

Por otro lado, debe mencionarse que la capacidad predictiva del retraso del crecimiento del índice de pobreza multidimensional es inferior a la del puntaje del Sisbén III, como se había constatado previamente en un estudio similar realizado en Manizales (48). La explicación se basa en que el índice incluye información ya contenida en el puntaje del Sisbén III (49), lo cual es importante porque los responsables de decisiones de cada municipio cuentan con dicho puntaje para focalizar intervenciones en los hogares críticos y muy

críticos, según la metodología del presente estudio, sin necesidad de hacer complejos análisis estadísticos o matemáticos adicionales.

Por último, las limitaciones de este estudio se relacionan con la ausencia de información confiable de las mismas variables estudiadas en estratos diferentes a los que incluye la base de datos del Sisbén y, por lo tanto, sus resultados no pueden generalizarse a todos los menores de cinco años del departamento de Caldas.

#### Conflicto de intereses

Los autores manifestamos no haber tenido ningún conflicto de intereses en ninguna de las fases de esta investigación.

#### **Financiación**

El estudio contó con aportes de la Secretaría de Planeación del Departamento de Caldas, de la Universidad de Caldas y de la Universidad Nacional, sede Manizales.

#### Referencias

- Prendergast A, Humphrey J. The stunting syndrome in developing countries. Paediatr Int Child Health. 2014;34:250-65. https://doi.org/10.1179/2046905514Y.0000000158.
- De Onis M, Blossner M, Borghi E. Prevalence and trends of stunting among pre-school children, 1990-2020. Public Health Nutr. 2011;15:142-8. https://doi.org/10.1017/S1368 980011001315
- Leroy JL, Ruel M, Habicht JP, Frongillo EA. Using height-for-age differences (HAD) instead of height-for-age z-scores (HAZ) for the meaningful measurement of population-level catch-up in linear growth in children less than 5 years of age. BMC Pediatr. 2015;15:145. https://doi.org/10.1186/s12887-015-0458-9
- Delisle HF. Poverty: The double burden of malnutrition in mothers and the intergenerational impact. Ann NY Acad Sci. 2008;1136:172-84. https://doi.org/10.1196/annals.1425.026
- Han Z, Lutsiv O, Mulla S, McDonald SD. Maternal height and the risk of preterm birth and low birth weight: A systematic review and meta-analyses. J\_Obstet Gynaecol Can. 2012;34:721-46. https://doi.org/10.1016/S1701-2163 (16)35337-3
- Shah PS, Shah V, Knowledge Synthesis Group on Determinants of Preterm/IBW Births. Influence of the maternal birth status on offspring: A systematic review and meta-analysis. Acta Obstet Gynecol Scand. 2009;88:1307-18. https://doi.org/10.3109/00016340903358820
- Zhang G, Bacelis J, Lengyel C, Teramo K, Hallman M, Helgeland O, et al. Assessing the causal relationship of maternal height on birth size and gestational age at birth: A Mendelian randomization analysis. PLoS Med. 2015;12:e1001865. https://doi.org/10.1371/journal.pmed. 1001865
- 8. Britto RP, Florêncio TM, Benedito AA, Sesso R, Cavalcante JC, Sawaya AL. Influence of maternal height and weight on

- low birth weight: A cross-sectional study in poor communities of northeastern Brazil. PLoS One. 2013;8:e80159. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080159
- Martorell R, Zongrone A. Intergenerational influences on child growth and undernutrition. Paediatr Perinat Epidemiol. 2012;26(Suppl.1):302-14.https://doi.org/10.1111/j.1365-3016. 2012.01298.x
- Parra DC, lannotti L, Gómez LF, Pachón H, Haire-Joshu D, Sarmiento OL, et al. The nutrition transition in Colombia over a decade: A novel household classification system of anthropometric measures. Arch Public Health. 2015;73:12. https://doi.org/10.1186/s13690-014-0057-5
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística.
   Colombia Índice de pobreza multidimensonal. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2016. Disponible en: http:// formularios.dane.gov.co/Anda\_4\_1/index.php/catalog/254.
- Sarmiento OL, Parra DC, González SA, González-Casanova I, Forero AY, Garcia J. The dual burden of malnutrition in Colombia. Am J Clin Nutr. 2014;100:1628S-35. https://doi.org/10.3945/ajcn.114.083816
- World Health Organization. Childhood stunting: Challenges and opportunities. Report of a colloquium. Geneva: World Health Organization; 2014. Fecha de consulta: 23 de octubre de 2015. Disponible en: http://apps.who.int/iris/ bitstream/10665/107026/1/WHO\_NMH\_NHD\_GRS\_14.1\_ eng.pdf?ua=1
- Hong R, Hong R. Economic inequality and undernutrition in women: Multilevel analysis of individual, household, and community levels in Cambodia. Food Nutr Bull. 2007;28:59-66. https://doi.org/10.1177/156482650702800107
- 15. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2010 –ENSIN 2010–. Fecha de consulta: 23 de octubre de 2015. Disponible en: http://www.icbf.gov.co/portal/page/portal/ PortallCBF/Bienestar/ENSIN1/ENSIN2010/LibroENSIN2010. ndf
- Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo. Objetivos de Desarrollo del Milenio. Colombia, 2014. Fecha de consulta: 23 de octubre de 2015. Disponible en: http://www.undp.org/content/dam/undp/library/MDG/english/MDG%20 Country%20Reports/Colombia/informeanualodm2014.pdf.
- 17. Gobernación de Caldas, Universidad Nacional de Colombia. Diagnóstico nutricional del departamento de Caldas. Manizales: 2014. p. 67. Fecha de consulta: 23 de octubre de 2015. Disponible en: http://190.14.226.29/desca/san/Diagn%C3%B3stico%20nutricional%20de%20 Caldas%202014.pdf.
- Monteiro CA, Benicio MH, Konno SC, Silva AC, Lima AL, Conde WL. Causes for the decline in child under-nutrition in Brazil, 1996-2007. Rev Saúde Pública. 2009;43:35-43. https://doi.org/10.1590/S0034-89102009000100005
- Programa Mundial de Alimentos, Gobernación de Caldas, Universidad de Manizales. Estudio de línea de base para la reducción de la pobreza en el departamento de Caldas. Manizales: Programa Mundial de Alimentos; 2010. p. 1-81.
- Organización Mundial de la Salud. WHO Anthro (version 3.2.2, January 2011) and macros. Fecha de consulta: 23 de octubre de 2015. Disponible en: http://www.who.int/ childgrowth/software/en/

- República de Colombia. Resolución 3778 de agosto 30 de 2011. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2016. Disponible en: https://www.sisben.gov.co/ConsultadePuntaje.aspx
- 22. Jaramillo JF. Efecto del programa batuta en el nivel de logro educativo: pruebas saber 11 de lenguaje y matemática. Fundación Luker. Batuta un programa para cerrar brechas. Manizales: Fundación Luker; 2013. p. 1-20.
- Echeverri LM, Horst E, Parra JH. Imagen país de Colombia desde la perspectiva extranjera. Arbor. 2015;191:a244 https://doi.org/10.3989/arbor.2015.773n3014
- Mackenzie T, Buitrago MT, Giraldo P, Parra JH. Factores que explican la relación principal-agente en seis empresas de la ciudad de Manizales. Equidad y Desarrollo. 2014;22:137-63.
- 25. República de Colombia, Ministerio de Salud. Resolución No 008430 del 4 de octubre de 1993. Fecha de consulta: 25 de noviembre de 2015. Disponible en: https://www.invima.gov.co/images/pdf/medicamentos/resoluciones/etica\_res\_8430\_1993.pdf.
- 26. República de Colombia, Departamento Nacional de Planeación, Subdirección de Promoción Social y Calidad de Vida. Decreto 4816 del 23 de diciembre de 2008. Guía para el uso del Sisbén III versión 2.0. Fecha de consulta: 25 de noviembre de 2015. Disponible en: https://www.sisben.gov.co/Portals/0/Documentos/Documentos%20 Metodologicos/08.%20Gu%C3%ADa%20para%20el%20 uso%20del%20Sisben%20III-version2.pdf.
- 27. Attanasio O, Syed M, Vera-Hernández M. Early evaluation of a new nutrition and education programme in Colombia. London: The Institute for Fiscal Studies Briefing; 2004. Fecha de consulta: 29 de marzo de 2016. Disponible en: https://www.ifs.org.uk/bns/bn44.pdf
- Attanasio O, Mesnard A. The impact of a conditional cash transfer programme on consumption in Colombia. London: The Institute for Fiscal Studies; 2005. https://doi. org/10.1111/j.1475-5890.2006.00041.x
- 29. Attanasio O, Gómez LC, Heredia P, Vera- Hernández M. The short-term impact of a conditional cash subsidy on child health and nutrition in Colombia. London: The Institute for Fiscal Studies; 2004. Fecha de consulta: 30 de marzo de 2016. Disponible en: http://www.ifs.org.uk/edepo/rs\_fam03.pdf
- 30. Atanasio O, Battistin E, Fitzsimons E, Mesnard A, Vera-Hernández M. How effective are conditional cash transfers? Evidence from Colombia. London: The Institute for Fiscal Studies; 2005. Fecha de consulta: 30 de marzo de 2016. Disponible en: http://www.ifs.org.uk/bns/bn54.pdf
- 31. Jiménez-Benítez J, Rodríguez-Martín A, Jiménez-Rodríguez R, Red de Malnutrición en Iberoamérica del Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (Red Mel-CYTED). Análisis de determinantes sociales de la desnutrición en Latinoamérica. Nutr Hosp. 2010;25(Supl.3):18-25.
- FAO. Conferencia Internacional de Nutrición. Roma: FAO;
   1992. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2016. Disponible en: http://www.fao.org/docrep/v7700t/v7700t04.htm.
- 33. **Hoddinott J, Rosegrant M, Torero M.** Hunger and malnutrition. Investments to reduce hunger and undernutrition.

- Copenhagen: Copenhagen Consensus Center; 2012. Fecha de consulta: febrero 12 de 2016. Disponible en: http://www.copenhagenconsensus.com/sites/default/files/hungerandmalnutrition.pdf.
- 34. Institute for Fiscal Studies. Baseline report on the evaluation of Familias en Acción; 2004. p. 1-167. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2016. Disponible en: http://www.ifs.org.uk/edepo/wps/familias\_accion.pdf.
- 35. Martínez R, Fernández A. Modelo de análisis del impacto social y económico de la desnutrición infantil en América Latina. Serie Manuales No. 52. Santiago de Chile: CEPAL/PMA; 2006. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2016. Disponible en: https://colaboracion.dnp.gov.co/CDT/Desarrollo%20 Social/Modelo%20de%20an%C3%A1lisis%20del%20 impacto.pdf.
- Prosperidad Social. Subdirección de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2016. Disponible en: http://www.prosperidadsocial.gov.co/pro/gd2/ Paginas/Subdirecci%C3%B3n-de-Seguridad-Alimentaria-y-Nutrici%C3%B3n.aspx.
- Ministerio de Educación. Programa de Alimentación Escolar. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2016. Disponible en: http://www.mineducacion.gov.co/1759/w3-propertyvalue-55307.html.
- Sawaya A, Sesso R, de Menezes T, Fernández M, Martins P. Association between chronic undernutrion and hypertension. Matern Child Nutr. 2005;1:155-63. https://doi. org/10.1111/j.1740-8709.2005.00033.x
- Galván M, Amigo H. Programas destinados a disminuir la desnutrición crónica: una revisión en América Latina. ALAN. 2007;57:316-26.
- Dewey G, Brown H. Update on technical issues concerning complementary feeding of young children in developing countries and implication for intervention programs. Food Nutr Bull. 2003;24:5-28. https://doi.org/10. 1177/156482650302400102
- 41. UNICEF. Lineamientos estratégicos para la erradicación de la desnutrición crónica infantil en América Latina y el Caribe. Guías para líneas de acción. Panamá; 2008. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2016. Disponible en: http:// www.unicef.org/lac/final\_estrategia\_nutricion(5).pdf.

- 42. Paraje G. Evolución de la desnutrición crónica infantil y su distribución socioeconómica en siete países de América Latina y el Caribe. Serie Políticas Sociales No. 140. Santiago de Chile: CEPAL/UNICEF; 2008. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2016. Disponible en: http://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/6145/S0800165\_es.pdf;jsessionid=97C10E3EC71AE923732E268D3D56CF1E?sequence=1.
- 43. Sobrino M, Gutiérrez C, Cunha AJ, Dávila M, Alarcón J. Desnutrición infantil en menores de cinco años en Perú: tendencias y factores determinantes. Rev Panam Salud Pública. 2014;35:104-12.
- 44. Reyes H, Pérez-Cuevas R, Sandoval A, Castillo R, Santos JI, Doubova S, et al. The family as a determinant of stunting in children living in conditions of extreme poverty: A case-control study. BMC Public Health. 2004;4:57. https://doi.org/10.1186/1471-2458-4-57
- Wolde M, Berhan Y, Chala A. Determinants of underweight, stunting and wasting among schoolchildren. BMC Public Health. 2015;15:8. https://doi.org/10.1186/s12889-014-1337-2
- 46. Fikadu T, Assegid S, Dube L. Factors associated with stunting among children of age 24 to 59 months in Meskan district, Gurage Zone, South Ethiopia: A case-control study. BMC Public Health. 2014;14:800. https://doi.org/10. 1186/1471-2458-14-800
- Larrea C, Freire W. Social inequality and child malnutrition in four Andean countries. Rev Panam Salud Pública. 2002;11: 356-64. https://doi.org/10.1590/S1020-49892002000500010
- 48. Aguirre JV, Román RN, Gómez SS, Parra JH, Benjumea MV. Modelos explicativos de desnutrición crónica como estrategia para focalizar los hogares más vulnerables con población menor de cinco años de estratos uno a tres en Manizales (tesis). Manizales: Universidad Autónoma de Manizales; 2013. Fecha de consulta: 2 de septiembre de 2015. Disponible en: http://repositorio.autonoma.edu. co/jspui/bitstream/11182/760/1/TESIS%20FINAL%20 MAESTRIA.pdf.
- 49. Departamento Nacional de Planeación, Subdirección de Promoción Social y Calidad de Vida, CEDE, Universidad de Ios Andes. Índice SISBEN tercera versión. 2007-2008. Resumen Ejecutivo; 2008. p. 1-35. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2016. Disponible en: https://www.sisben.gov.co/ Portals/0/Documentos/Documentos%20Tecnicos/01.%20 Sisben3\_SV120210.pdf

#### ARTÍCULO ORIGINAL

### Curvas de fusión de regiones genómicas específicas: una herramienta prometedora para el diagnóstico y tipificación de las especies causantes de la leishmaniasis cutánea en Colombia

Johana Marín<sup>1</sup>, Daniel Urrea<sup>1,2</sup>, Carlos Muskus<sup>3</sup>, María Clara Echeverry<sup>4</sup>, Ana María Mejía<sup>1</sup>, Omar Triana<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Biología y Control de Enfermedades Infecciosas, Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia
- <sup>2</sup> Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia
- <sup>3</sup> Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
- <sup>4</sup> Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** La leishmaniasis cutánea es una enfermedad causada por parásitos del género *Leishmania* que tiene gran incidencia en Colombia. El diagnóstico y la identificación de la especie infecciosa son factores críticos en el momento de escoger e iniciar el tratamiento. Actualmente, los métodos de diagnóstico y tipificación requieren procedimientos complejos, por lo que es necesario validar nuevos marcadores moleculares y métodos que simplifiquen el proceso.

**Objetivo.** Desarrollar una herramienta basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con curvas de fusión (*High Resolution Melting;* PCR-HRM) para el diagnóstico y tipificación de las tres especies de *Leishmania* de importancia epidemiológica en casos de leishmaniasis cutánea en Colombia.

**Materiales y métodos.** Los genomas de *Leishmania panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis* se compararon mediante métodos bioinformáticos. Las regiones específicas de especie identificadas se validaron mediante PCR. Para los marcadores seleccionados se diseñó una PCR-HRM y se estimaron algunos parámetros de validez y seguridad usando aislamientos de pacientes colombianos caracterizados previamente mediante PCR y análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP; PCR-RFLP) del gen *hsp*70.

**Resultados.** El análisis genómico comparativo mostró 24 regiones específicas de especie. Sin embargo, la validación mediante PCR solo identificó un marcador específico para cada especie de *Leishmania*. Los otros marcadores mostraron amplificación cruzada. El límite de detección para los tres marcadores seleccionados fue de un parásito, mientras que la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el negativo fueron de 91,4, 100, 100 y 75 %, respectivamente.

**Conclusiones.** Las tres regiones seleccionadas pueden emplearse como marcadores moleculares en el diagnóstico y tipificación de las especies causantes de la leishmaniasis cutánea en Colombia.

**Palabras clave:** Leishmania; leishmania/diagnóstico; leishmaniasis cutánea; reacción en cadena de la polimerasa; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3634

High-resolution melting analysis based on specific genomic regions: A promising tool for the diagnosis and typing of species causing cutaneous leishmaniasis in Colombia

**Introduction:** Cutaneous leishmaniasis, caused by parasites of the genus *Leishmania*, is a disease with high incidence in Colombia. The diagnosis and identification of the infectious species are critical factors when selecting and initiating treatment. Currently, the methods for diagnosing and typing cutaneous leishmaniasis require complicated procedures and there is a need for the validation of new molecular markers and methods to simplify the process.

**Objective:** To develop a tool based in PCR melting curves (PCR-HRM) for the diagnosis and typing of the three *Leishmania* species of epidemiological importance for cutaneous leishmaniasis in Colombia.

#### Contribución de los autores:

Ana María Mejía y Omar Triana: concepción y diseño del estudio

Johana Marín: experimentos

Carlos Muskus y María Clara Echeverry: experimentos con PCR-RFLP en muestras de control y muestras clínicas

Daniel Urrea: analisis bioinformáticos de las secuencias, comparación de genomas y selección de los marcadores específicos de especie

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

**Materials and methods:** The genomes of *Leishmania panamensis, L. braziliensis* and *L. guyanensis* were compared with bioinformatic methods. The species-specific regions were then validated using PCR. For the selected markers, a PCR-HRM was designed, and validity and security parameters were estimated using isolates from Colombian patients previously characterized by PCR-RFLP of the *hsp70* gene.

**Results:** The comparative genomic analysis yielded 24 species-specific regions. However, the PCR validation identified only one marker that was specific to each *Leishmania* species. The other markers showed cross amplification. The detection limit for the three selected markers was one parasite. The sensitivity, specificity, predictive positive and negative values were 91.4%, 100%, 100% and 75%, respectively.

**Conclusions:** The three selected regions can be used as molecular markers in the diagnosis and typing of the causative species of cutaneous leishmaniasis in Colombia.

**Key words:** Leishmania; leishmania/diagnosis; leishmaniasis, cutaneous; polymerase chain reaction; Colombia

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3634

Se denomina leishmaniasis a un grupo de antropozoonosis causadas por diferentes especies de parásitos del género Leishmania y trasmitidas principalmente por la picadura de insectos hematófagos de los géneros Lutzomyia spp. para el Nuevo Mundo y Phlebotomus spp. para el Viejo Mundo (1,2). Estas enfermedades son endémicas en más de 98 países, y afectan a 12 millones de personas, en tanto que más de 350 millones están en riesgo de infección en el mundo (3). En Colombia, la leishmaniasis es endémica en casi todo el territorio y representa un problema significativo de salud pública debido a su alta morbilidad. En el país se han estimado alrededor de 10.000 casos por año, v casi 10 millones de personas en riesgo de adquirir la infección, principalmente en áreas rurales (4).

En el Nuevo Mundo se encuentran distribuidas 16 especies de *Leishmania*, las cuales son causantes de una gran diversidad de síntomas clínicos (3). En Colombia se ha registrado la circulación de las especies *L. panamensis, L. braziliensis, L. amazonensis, L. mexicana, L. guyanensis* y *L. infantum*, siendo las dos primeras las de más alta distribución a lo largo del territorio nacional y, por consiguiente, las principales responsables de la alta prevalencia de la leishmaniasis cutánea en el país (4).

El diagnóstico acertado de la infección con *Leishmania* sp, así como la identificación de la especie infecciosa, son críticos en el momento de escoger e iniciar el tratamiento apropiado. En este sentido,

Correspondencia:

Omar Triana, Grupo Biología y Control de Enfermedades Infecciosas, Universidad de Antioquia, Calle 70 N° 52-21, Medellín, Colombia

Teléfono: (574) 219 6520 omar.triana@udea.edu.co

Recibido: 18/10/16; aceptado: 26/02/17

la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado que el tratamiento solo se debe administrar tras la confirmación de la enfermedad. y en algunas regiones del Nuevo Mundo el diagnóstico debe considerar la especie, ya que se ha demostrado que las especies infecciosas y la región geográfica influyen en la eficacia de los tratamientos y, por consiguiente, en las recomendaciones terapéuticas. Esto es de gran importancia debido a la alta toxicidad de los medicamentos disponibles, la resistencia observada en algunas especies, especialmente las causantes de la leishmaniasis cutánea, en la cual parece haber mayor riesgo de selección de parásitos farmacorresistentes, y el uso restringido de los medicamentos en los pacientes confirmados (3). Asimismo, debido a la gran similitud entre los síntomas causados por Leishmania spp. y otros grupos de enfermedades (5,6), y la gran cantidad de especies de *Leishmania* que circulan en el continente americano, el diagnóstico rápido y certero debe mejorarse (7-9).

En la actualidad no se dispone de un método de gran poder discriminatorio que pueda aplicarse de manera universal al diagnóstico y a la identificación de las especies causantes de la leishmaniasis cutánea (10). El diagnóstico se basa en la descripción de las características clínicas, además del análisis de los datos epidemiológicos y las pruebas de laboratorio, así como en métodos de observación directa de las formas parasitarias mediante microscopía (11). En este contexto, los nuevos métodos basados en blancos moleculares han ido cobrando relevancia por sus valores de sensibilidad y especificidad (12). Tales métodos se basan principalmente en la amplificación de regiones genómicas, como las de los genes hsp70 (13) y del citocromo b (14), o de espaciadores intergénicos ribosomales como el ITS-1 y el ITS-2 rRNA (2,15), o el ADN del cinetoplasto. Además, se dispone de métodos moleculares adicionales, como la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) o la PCR-RFLP, que también pueden emplearse en la identificación de la especie infecciosa (10,11).

Dado lo anterior, se requiere el diseño de estrategias novedosas para la identificación de regiones específicas en las especies de Leishmania, que permitan tanto el diagnóstico como la identificación de la especie. En los últimos años se han logrado grandes avances en el conocimiento de la estructura y la composición genómica de los tripanosomátidos gracias al desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva (16,17). Para el género Leishmania se han reportado hasta ahora al menos 14 genomas secuenciados (http://tritrypdb. org/tritrypdb/), entre los cuales se encuentran el de L. panamensis y L. braziliensis, responsables del mayor número de casos de leishmaniasis cutánea en Colombia. A partir de estas bases de datos es posible comparar la estructura y la composición genómica de estas especies, con el fin de identificar regiones específicas que puedan ser útiles para su diagnóstico e identificación, lo cual puede validarse experimentalmente mediante técnicas de PCR avanzadas de alto poder resolutivo como la HRM. En este sentido, en el presente trabajo se propuso la búsqueda y selección de nuevos marcadores moleculares específicos de especie derivados del análisis genómico comparativo de L. panamensis, L. braziliensis y L. guyanensis, que permitan el diagnóstico y la identificación de las especies causantes de la enfermedad en nuestro país.

#### Materiales y métodos

#### Material biológico y extracción del ADN

El ADN de las cepas de L. panamensis (cepa UA-946, Universidad de Antioquia), L. guyanensis (MHOM/BR/75/M4147), y L. braziliensis (MHOM/ BR/75/M2904) se utilizó para validar los marcadores seleccionados. Se utilizaron muestras del ADN de L. major (MHOM/IL/81/FE/BNI). Trypanosoma cruzi (MRAT/COL/Gal61), T. evansi y T. rangeli (2XeqC2) para evaluar las reacciones cruzadas con otros tripanosomátidos. El ADN se extrajo a partir de cultivos in vitro siguiendo el protocolo del estuche DNeasy Blood & Tissue (Qiagen). La calidad del ADN obtenido se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % teñidos con bromuro de etidio, y la concentración se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

## Identificación de regiones genómicas específicas en Leishmania spp

Con el fin de seleccionar regiones genómicas específicas para las tres especies de *Leishmania* causantes de la leishmaniasis cutánea en Colombia, se hizo un análisis comparativo entre los genomas de *L. panamensis* y *L. braziliensis* (publicados en la base de datos de TriTryp: http://tritrypdb.org/tritrypdb/) con los datos crudos del genoma de *L. guyanensis* (número de acceso en el Genbank: PRJEB168). Un esquema general de la metodología empleada se muestra en la figura 1; el alineamiento global de los tres genomas completos ensamblados se realizó usando el programa MUMmer (18), con el fin de hallar regiones genómicas con identidades mayores de 75 % entre pares de especies. Se seleccionaron

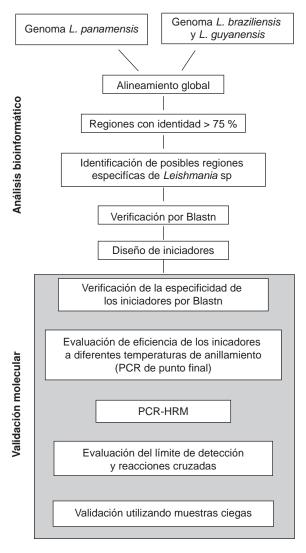


Figura 1. Algoritmo utilizado para la selección y validación de los nuevos marcadores moleculares

las regiones con una identidad menor de 25 % y posteriormente se validaron como regiones específicas de especie mediante BLASTN® (blast.ncbi. nlm.nih.gov), contrastándolas con las bases de datos de Assembly, BioProject y SRA del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Una vez confirmada la ausencia de ortología entre las especies evaluadas, se diseñaron iniciadores para cada región específica usando la herramienta Primer3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/).

# Amplificación de marcadores específicos en L. panamensis, L. braziliensis y L. guyanensis

La amplificación por PCR convencional de los marcadores de cada especie se hizo en un volumen final de 25 µl que contenía 1X de solución tampón Taq, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 0,4 µM de cada cebador, 1 U de Taq polimerasa y 10 ng del molde de ADN. La PCR se hizo en un termociclador T1 (Biometra) bajo las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, una temperatura de anillamiento desde 58 °C hasta 64 °C durante 15 segundos, y una extensión a 72 °C durante 20 segundos, con una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % (w/v). Para cada uno de los marcadores analizados por PCR se utilizó el ADN de L. panamensis, L. guyanensis y L. braziliensis como control.

### Curvas de fusión en Leishmania spp. de Colombia

Los marcadores que amplificaron regiones específicas mediante la PCR convencional se evaluaron seguidamente mediante PCR en tiempo real complementada con curvas de fusión de alta resolución en el equipo para PCR en tiempo real Rotor-Gene Q (Qiagen). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen total de 10 µl, el cual contenía 5 µl de HRM PCR master mix Type-it® 2X (Qiagen), 0,4 µM de cada cebador y 10 ng de molde de ADN. El perfil térmico consistió de un ciclo de desnaturalización y activación de la enzima a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación incluida la desnaturalización de ADN a 95 °C durante 15 segundos y anillamiento a 64 °C durante 1 minuto. Los productos de PCR se sometieron a un programa de curvas de fusión que consistió en la desnaturalización a 95 °C durante 10 segundos, hibridación de ADN de doble cadena a 64 °C durante 1 minuto, seguida de un aumento gradual de la temperatura hasta 95 °C durante 120 minutos, y unión final de ADN a 64 °C durante 15 segundos. Para determinar las temperaturas medias de fusión (Tm) para cada especie se utilizó el programa Rotor-Gene Q v 2.0.2 (Qiagen).

### Límite de detección de los marcadores

Con el fin de estimar el límite de detección de los marcadores seleccionados, cada una de las regiones específicas de especie elegidas se clonó en el vector pTZ57R/T (ThermoFisher Scientific) bajo las condiciones previamente reportadas (19). A partir de estos, se hicieron diluciones seriadas (1:10) del plásmido que contenía la secuencia blanco de los cebadores de cada una de las especies de Leishmania y se estimó la concentración mínima de amplificación. Para ello se utilizaron siete diluciones seriadas por triplicado del ADN de los controles positivos L. panamensis, L. guyanensis y L. braziliensis, que iban desde 1.000.000 hasta una copia del plásmido que contenía la región de interés. Para determinar la eficiencia de cada ensayo se estimaron las curvas de calibración a partir de los ciclos de umbral (threshhold cycles) Ct de las diluciones utilizando el programa Rotor-Gene Q v 2.0.2 (Qiagen).

### Reacciones cruzadas

Para corroborar que los marcadores seleccionados no amplificaran en otras especies de tripanosómatidos, el ADN de *L. major, T. cruzi, T. evansi y T. rangeli* se utilizó como molde para la reacción de PCR bajo las mismas condiciones descritas previamente. Este ensayo se realizó por triplicado con 10 ng del ADN de cada especie.

## Utilidad de los marcadores para el diagnóstico de las muestras de los pacientes

Para evaluar la utilidad de los marcadores seleccionados, se probaron en total 41 muestras ciegas que contenían ADN de cepas de cultivo o de muestras de ADN aisladas de biopsias de pacientes de Colombia, así como muestras de humanos negativas (nunca habían estado en contacto con el parásito) y muestras de pacientes presuntivas de infección con leishmaniasis, pero que por otros métodos fueron negativas en los distintos análisis. Todas las muestras positivas se caracterizaron previamente mediante PCR-RFLP utilizando el marcador hsp70 (13,20-22). Este conjunto de muestras ciegas se evaluó mediante PCR-HRM por triplicado, utilizando como control en todas las reacciones el ADN de L. panamensis, L. guyanensis y L. braziliensis. A partir de esta información y con base en los resultados, se determinó la concordancia entre las pruebas PCR-RFLP y la PCR-HRM para las muestras positivas.

### Validez y seguridad de los marcadores

A partir de los resultados obtenidos se estimaron la sensibilidad (S), la especificidad (E), el valor predictivopositivo(VPP) y el valor predictivo negativo (VPN), que dan cuenta de la validez y la seguridad de los nuevos marcadores. Estos parámetros se calcularon con el paquete estadístico epiR, del programa R, versión 3.2.2 (*The R Foundation for Statistical Computing Platform*), con intervalos de confianza de 95 % (23,24).

### Resultados

### Identificación de regiones específicas, validación mediante PCR convencional y determinación de la especificidad analítica

Las comparaciones pareadas entre el genoma de L. panamensis y los de L. guyanensis y L. braziliensis mostró 4.422 y 10.700 regiones genómicas con identidad menor de 25 %, respectivamente. El 98% de las diferencias entre estas regiones en las especies correspondió a deleciones, y solo 2 % a regiones con diferencias específicas en los nucleósidos. Se seleccionaron 24 regiones como específicas de especie, las cuales se emplearon en el diseño de los cebadores para validar la especificidad mediante PCR. Solo tres pares de cebadores amplificaron únicamente en la especie de Leishmania para la cual se diseñaron (figura 2A, cuadro 1). Los otros 21 cebadores amplificaron en más de una especie de Leishmania (figura 2B; figura suplementaria 1 disponible en: https://doi. org/10.7705/biomedica.v34i2.3634; cuadro 1).

### Límite de detección

Los tres marcadores específicos de especie seleccionados se utilizaron en la PCR en tiempo real, con el fin de evaluar su utilidad en el diagnóstico y tipificación en cepas y muestras clínicas. En la figura 3 se observa que cada uno de los marcadores fue capaz de detectar hasta una copia de la secuencia blanco. Este ensayo se hizo por triplicado siempre con el mismo resultado. Además, a partir de los valores de Ct de cada una de las diluciones, se estimaron los porcentajes de eficiencia de la amplificación en cada una de las especies evaluadas: 94,33, 95,73 y 90,92 % para *L. panamensis, L. guyanensis y L. braziliensis*, respectivamente (cuadro 2).

### Curvas de fusión

Los tres marcadores que se seleccionaron también se analizaron mediante curvas de fusión. Los resultados indicaron que estos marcadores diferenciaron claramente las especies de *L. panamensis*, L. guyanensis y L. braziliensis (figura 4). Las temperaturas de fusión (Tm) para cada marcador se muestran en el cuadro 2; se observa que luego de tres corridas estas fueron altamente reproducibles (no se muestran los datos).

# Utilidad de los marcadores en muestras de pacientes

De las 32 muestras clasificadas previamente como positivas con otros marcadores, 29 amplificaron con los marcadores seleccionados, lo que significó una concordancia de 90,63 % con la PCR-RFLP del gen hsp70 que se utilizó previamente para caracterizar los aislamientos. Las nueve muestras negativas se clasificaron correctamente (cuadro 3). El análisis estadístico mostró valores de sensibilidad de 91,43 % (IC $_{95\%}$ : 75-98 %) y de especificidad de 100 % (IC $_{95\%}$ : 55-100 %), un valor predictivo positivo de 100 % (IC $_{95\%}$ : 83-100 %) y un valor predictivo negativo de 75 % (IC $_{95\%}$ : 43-95 %).

### Discusión

En Colombia la leishmaniasis cutánea es causada principalmente por *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis*, especies que responden diferencialmente al tratamiento con glucantime, por lo cual el diagnóstico y la tipificación apropiada de su agente causal son aspectos críticos en el momento

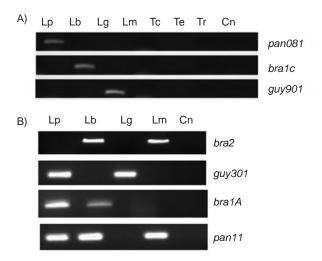
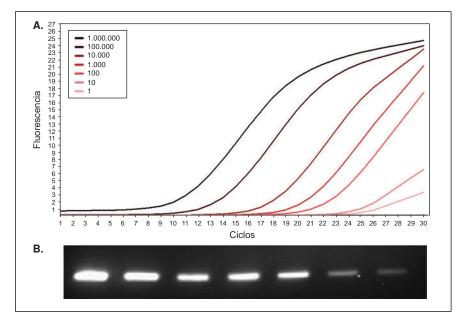


Figura 2. A: Productos de la amplificación de los marcadores seleccionados (Pan081, Guy901 y Bra1C). Se observa la amplificación única en la especie de *Leishmania* para la que el marcador fue diseñado. En los carriles se muestran los siguientes: Lp: *L. panamensis*, Lb: *L. braziliensis*, Lg: *L. guyanensis*, Lm: *L. major*, Tc: *T. cruzi*, Te: *T. evansi*, Tr: *T. rangeli* y Cn: control negativo. B: Gel representativo de los productos de PCR de los marcadores que amplificaron en más de una especie de *Leishmania*. En los carriles se muestran los de Lp: *L. panamensis*, Lb: *L. braziliensis*, Lg: *L. guyanensis*, Lm: *L. major* y Cn: control negativo.

**Cuadro 1.** Regiones genómicas específicas evaluadas para las tres especies. Los marcadores Bra1A, Bra1C, Pan081 y Guy901 fueron los únicos específicos de especie.

Especie	Regiones
L. panamensis y L. guyanensis	Pan02, Pan041, Pan042, Pan11, Pan13, Pan25.
L. panamensis y L. braziliensis	Bra1A
L. braziliensis y L. guyanensis	Bra1B, Bra2
L. panamensis, L. braziliensis y L. guyanensis	Pan082, Pan09, Pan10, Pan17, Pan19, Pan21, Pan301, Pan302, Pan303, 3661, 3662, S615
L. panamensis	Pan081
L. guyanensis	Guy901
L. braziliensis	Bra1C



**Figura 3. A.** Diluciones seriadas del plásmido que contiene la secuencia blanco de *L. panamensis* utilizando el marcador Pan081. **B.** Gel de agarosa al 2 % con los productos de PCR de cada una de las diluciones

**Cuadro 2.** Valores de temperatura de fusión (Tm), coeficiente de correlación (R²) y porcentajes de eficiencia de *L. panamensis*, *L. guyanensis y L. braziliensis* en el ensayo de PCR-HRM

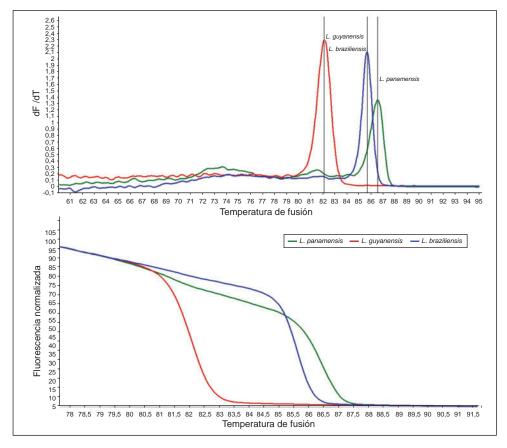
Especie	e Marcador		R²	Porcentaje de eficiencia	
L. panamensis	Pan081	86,55	0,992222	94,33 %	
L. guyanensis	Guy901	82,21	0,985675	95,73 %	
L. braziliensis	Bra1C	85,68	0,99780	90,92 %	

de decidir el tratamiento de elección, pues evita someter al paciente a tratamientos que podrían ser ineficaces y muy tóxicos (7,25).

El diagnóstico de la leishmaniasis se ha basado tradicionalmente en la clínica y en criterios epidemiológicos, y ciertas manifestaciones clínicas de la enfermedad se han asociado con complejos de especies o especies particulares, aunque se

han reportado infecciones atípicas que cuestionan esta afirmación. Por ejemplo, se han registrado nuevas variantes de la leishmaniasis cutánea en Honduras y Nicaragua causadas por *L. infantum*, y hay algunos reportes de leishmaniasis visceral causada por *L. braziliensis* (26). Dado que estas infecciones atípicas son clínicamente idénticas a las típicas y pueden ocurrir en áreas donde se encuentren varias especies de *Leishmania*, es necesaria la implementación de métodos capaces de distinguir entre varias especies de *Leishmania*.

Actualmente, la mayoría de métodos de diagnóstico molecular aplicados a la identificación de especies de *Leishmania* se basan en la técnica de PCR-RFLP, que aunque menos laboriosa que el análisis de isoenzimas (considerado como el método de referencia), presenta problemas de reproducibilidad y su análisis es complejo (12). Para la PCR-RFLP



**Figura 4. A.** Temperatura de fusión (Tm) obtenida para cada uno de estos marcadores (Pan081: 86,55 °C para *L. panamensis*, Guy901: 82,21 °C para *L. guyanensis* y Bra1C: 85,68 °C para *L. braziliensis*). **B.** Curvas de fusión normalizadas para las especies de *Leishmania* analizadas utilizando los marcadores Pan081, Bra1c y Guy901

se han utilizado varios blancos moleculares como el gen ssu rRNA, el gen hsp70, microsatélites o ADN mitocondrial (kDNA) (15,27,28), algunos de los cuales son menos sensibles que otros debido a su bajo número de copias. Se han descrito varios ensayos para la detección de parásitos y la discriminación de especies de Leishmania en el Nuevo Mundo (29,30), sin embargo, ninguno de estos métodos cumple con los dos objetivos de manera simultánea y, en ocasiones, pueden carecer de especificidad (31). Un diagnóstico molecular rápido específico de especie permite elegir el tratamiento más adecuado y hacer un seguimiento del parásito para fines epidemiológicos (investigación de brotes o seguimiento de cepas de parásitos resistentes a los medicamentos) (2). El análisis genómico comparativo de estas especies es una herramienta alternativa para la identificación de regiones específicas de especie y para el diseño de nuevos marcadores. En este sentido, el presente trabajo seleccionó regiones ortólogas altamente divergentes en estas tres especies

para proponer nuevos marcadores moleculares que permitan el diagnóstico y la tipificación en una prueba simple pero de gran resolución de la PCR, como las curvas de fusión.

La PCR-HRM es una herramienta atractiva para el diagnóstico de diferentes enfermedades. Esta técnica puede evitar el aislamiento de los parásitos en grandes cultivos celulares y métodos posteriores a la PCR, como las electroforesis, los cortes con enzimas de restricción, la hibridación y los métodos de secuenciación, lo cual disminuye los tiempos del diagnóstico y las posibilidades de contaminación (32). Este tipo de prueba también puede arrojar resultados tres veces más rápidamente y cinco veces más económicamente que otro tipo de análisis (33).

En este trabajo se estudiaron una serie de regiones a lo largo del genoma de las diferentes especies de *Leishmania* distribuidas en Colombia para encontrar las que se ajustaran adecuadamente a los parámetros necesarios para el ensayo de

**Cuadro 3.** Identificación mediante PCR-HRM con los tres marcadores utilizados en muestras previamente tipificadas mediante PCR-RFLP del gen *hsp*70. Se muestran los valores promedio de Tm.

Muestra	Identificación por PCR-RFLP de hsp70	Identificación por PCR-HRM	Tm (°C)
1	L. amazonensis	Negativa	0
2	L. braziliensis	L. braziliensis	85,7
3	L. braziliensis	L. braziliensis	85,8
4	L. braziliensis	L. braziliensis	85,7
5	L. braziliensis	L. braziliensis	85,7
6	L. braziliensis	L. braziliensis	85,8
7	L. braziliensis	L. braziliensis	85,7
8	L. braziliensis	L. braziliensis	85,7
9	L. braziliensis	L. braziliensis	85,6
10	L. braziliensis	Negativa	0
11	L. braziliensis	L. braziliensis	85,7
12	L. braziliensis	L. braziliensis	85,7
13	L. braziliensis	L. braziliensis	85,8
14	L. braziliensis	L. braziliensis	85,7
15	L. guyanensis	L. guyanensis	82,2
16	L. guyanensis	L. guyanensis	82,2
17	L. guyanensis	L. guyanensis	82,2
18	L. panamensis	L. panamensis	86,6
19	L. panamensis	L. panamensis	86,4
20	L. panamensis	L. panamensis	86,6
21	L. panamensis	L. panamensis	86,7
22	L. panamensis	Negativa	0
23	L. panamensis	L. panamensis	86,6
24	L. panamensis	Negativa	0
25	L. panamensis	L. panamensis	86,8
26	L. panamensis	L. panamensis	86,8
27	L. panamensis	L. panamensis	86,6
28	L. panamensis	L. panamensis	86,5
29	L. panamensis	L. panamensis	86,6
30	L. panamensis	L. panamensis	86,8
31	L. panamensis	L. panamensis	86,6
32 33	L. panamensis	L. panamensis	86,6
33 34	L. panamensis	L. panamensis	86,6
34 35	Negativa	Negativa	0
36	Negativa	Negativa	0
36 37	Negativa	Negativa	0 0
37 38	Negativa Negativa	Negativa Negativa	0
36 39	Negativa	Negativa Negativa	0
40	Negativa	Negativa	0
40	Negativa	Negativa	0
	- 3	- 3	

PCR-HRM. Se seleccionaron aquellas que cumplían con los criterios requeridos, entre los cuales se destaca el tamaño de la región (156-200 pb), y que se encontraran de manera específica en cada una de las especies. Así, un total de 24 regiones seleccionadas mediante una serie de análisis bioinformáticos se sometieron a diferentes ensayos de PCR para finalmente seleccionar tres regiones que podían ser potenciales blancos moleculares para el diagnóstico y la tipificación. Esto indica que, a pesar de la rigurosidad con la que se seleccionaron dichas regiones mediante

análisis bioinformáticos, siempre es necesario confirmarlas experimentalmente. Los marcadores seleccionados fueron altamente específicos, ya que ningún otro tripanosomátido se amplificó utilizando estos cebadores. Esto es importante porque existe la posibilidad de encontrar infecciones mixtas de *Leishmania* y *T. cruzi* (34).

Con los tres marcadores seleccionados se encontró una clara diferencia entre las temperaturas de fusión de las tres especies de *Leishmania*, lo cual permitiría su identificación incluso si no se cuenta con la herramienta de HRM. Además, los perfiles de las curvas de punto de fusión también sirven para diferenciar entre las especies, lo cual facilita el diagnóstico.

Para validar la utilidad de la PCR-HRM se hizo el diagnóstico de 33 muestras provenientes de pacientes colombianos, las cuales habían sido identificadas previamente a nivel de especie mediante PCR-RFLP del gen hsp70. Los resultados obtenidos mediante las dos técnicas fueron similares en un 90,6 %, lo cual demuestra que los nuevos marcadores son comparables con otro tipo de técnicas utilizadas comúnmente en la actualidad. Es importante resaltar que la prueba que se propone evita el uso de técnicas adicionales como la RFLP para el diagnóstico, lo cual permite que este sea más rápido y facilita la adopción de decisiones. Recientemente se reportó el uso de una nueva prueba molecular para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea causada por Leishmania (Viannia) spp, y aunque los resultados son de utilidad para estudios en campo por su capacidad para diferenciar especies del subgénero Leishmania, tiene la limitación de no diferenciar entre las especies del subgénero Viannia (35). La prueba empleada en este estudio tiene la ventaja de ser rápida y diferenciar estas especies, por lo que podría combinarse con la prueba en campo para hacer un diagnóstico diferencial más rápido v beneficioso para el paciente.

Por último, la prueba mostró una especificidad de 100 % y una sensibilidad de 91,4 %, lo que lleva a pensar en el mejoramiento de los métodos previos a la PCR, tales como la toma de muestras, la extracción de ADN y su posterior almacenamiento, de manera que se pueda obtener una mayor concentración de material genético y conservarlo durante mucho tiempo para aumentar el porcentaje de muestras positivas y mejorar la prueba.

La imposibilidad de tener una mayor cantidad de muestras para el análisis fue una gran limitante

del presente estudio, por lo que se sugiere que en investigaciones posteriores se valide la utilización de estos marcadores en la PCR-HRM como una herramienta de diagnóstico directa en una mayor cantidad de muestras, no solo de pacientes sino también de reservorios y vectores del parásito. Además, se podría explorar la posibilidad de la búsqueda de un mayor número de marcadores con mayor número de copias, lo cual mejoraría la sensibilidad del método. Todo ello generaría más información para mejorar el diagnóstico de la enfermedad y proponer estrategias para la prevención y el control de la leishmaniasis. Por otro lado, con la PCR-HRM y los marcadores descritos se podría cuantificar la carga parasitaria en las muestras en futuros estudios, lo que es de gran importancia para la vigilancia de la progresión de la enfermedad y el resultado final después del tratamiento (36).

En conclusión, estos resultados indican que el método permite la identificación de *Leishmania* en muestras clínicas, y es reproducible.

La PCR-HRM representa una herramienta alternativa para la identificación de las especies causantes de leishmaniasis cutánea directamente en las muestras clínicas. Hasta donde se sabe, este es el primer estudio en el que se describen nuevos marcadores para la detección e identificación de especies de Leishmania, y fue posible discriminar tres especies de Leishmania presentes en América. Además, los resultados concordaron con los obtenidos anteriormente mediante la técnica de PCR-RFLP, lo que sugiere que esta técnica puede ser de potencial aplicación en la detección de parásitos. No obstante, aún quedan pendientes ensayos que ayuden a dilucidar el verdadero poder de diagnóstico y tipificación del método, de manera que se pueda utilizar en los centros de salud de una manera rápida y efectiva y mejorar así el diagnóstico y la administración segura de los tratamientos a los pacientes, disminuyendo su duración, así como los problemas que se puedan presentar por una posible resistencia de los parásitos a los diferentes medicamentos.

### Conflicto de intereses

Los autores del presente artículo declaramos que no existe conflicto de intereses.

### Financiación

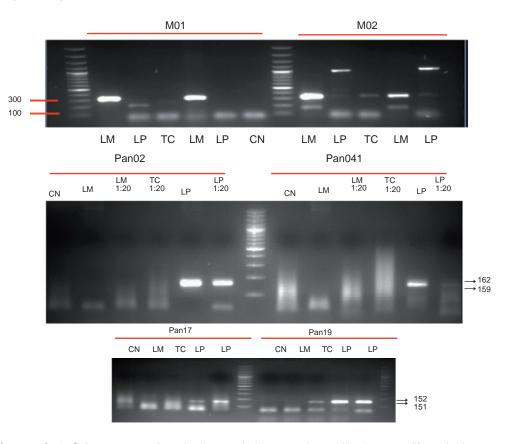
Este trabajo fue financiado por Colciencias (proyecto 111551929249) y por la Universidad de Antioquia.

### Referencias

- Mcgwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. QJM. 2014;107: 7-14. https://doi.or/10.1093/qjmed/hct116
- Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. J Clin Microbiol. 2007;45: 21-5. https://doi.or/10.1128/Jcm.02029-06
- World Health Organization. Control of the leishmaniases. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva: WHO; 2010.
- Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA, Battle KE, Brady OJ, et al. Global distribution maps of the Leishmaniases. Elife. 2014;3:e02851 https://doi.or/10.7554/eLife.02851.001
- Dantas Brito M, Campilho F, Branca R, Pinho Vaz C, Silva C, Sousa T, et al. Visceral leishmaniasis: A differential diagnosis to remember after bone marrow transplantation. Case Rep Hematol. 2014;2014:587912. https://doi.or/10. 1155/2014/587912
- Rodríguez-Brito S, Camacho E, Mendoza M, Niño-Vega GA. Differential identification of Sporothrix spp. and Leishmania spp. by conventional PCR and qPCR in multiplex format. Med Mycol. 2014;53: 22-7. https://doi. or/10.1093/mmy/myu065
- Fernández OL, Díaz-Toro Y, Ovalle C, Valderrama L, Muvdi S, Rodríguez I, et al. Miltefosine and antimonial drug susceptibility of Leishmania viannia species and populations in regions of high transmission in Colombia. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e2871. https://doi.or/10.1371/ journal.pntd.0002871
- Aït-Oudhia K, Gazanion E, Vergnes B, Oury B, Sereno D. Leishmania antimony resistance: What we know what we can learn from the field. Parasitol Res. 2011;109: 1225-32. https://doi.or/10.1007/s00436-011-2555-5
- Tuon F, Amato V, Graf M, Siqueira A. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis -a systematic review with a meta-analysis. Int J Dermatol. 2008;47:109-24. https://doi. or/10.1111/j.1365-4632.2008.03417.x
- Van der Auwera G, Dujardina JC. Species typing in dermal leishmaniasis. Clin Microbiol Rev. 2015;28:265-94.https:// doi.or/10.1128/CMR.00104-14
- Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010;8:419-33. https://doi.or/10.1586/eri. 10.19
- Ben Abda I, De Monbrison F, Bousslimi N, Aoun K, Bouratbine A, Picot S. Advantages and limits of realtime PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2011;105:17– 22. https://doi.or/10.1016/j.trstmh.2010.09.003
- Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin J-C, Van Der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:1453-61. https://doi. or/10.1007/s10096-011-1463-z
- González-Marcano E, Kato H, Concepción JL, Márquez ME, Mondolfi AP. Polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis: A species-specific approach. Methods Mol Biol. 2016;1392:113-24. https://doi.or/10.1007/978-1-4939-3360-0 11

- 15. Monroy-Ostria A, Nasereddin A, Monteon VM, Guzmán-Bracho C, Jaffe CL. ITS1 PCR-RFLP diagnosis and characterization of leishmania in clinical samples and strains from cases of human cutaneous leishmaniasis in states of the Mexican Southeast. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2014;2014:607287. https://doi.or/10.1155/2014/607287
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. Science. 2005;309:436-42. https://doi.or/10.1126/science.1112680
- 17. Parsons M, Worthey EA, Ward PN, Mottram JC. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: Leishmania major, Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi. BMC Genomics. 2005;6:127. https://doi.or/10.1186/1471-2164-6-127
- Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, et al. Versatile and open software for comparing large genomes. Genome Biol. 2004;5:R12. https://doi.or/10.1186/gb-2004-5-2-r12
- Clark JM, Joyce CM, Beardsley GP. Novel blunt-end addition reactions catalyzed by DNA polymerase I of Escherichia coli. J Mol Biol. 1987;198:123-7. https://doi. or/10.1016/0022-2836(87)90462-1
- Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: A universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. Parasitology. 2010;137:1159-68. https://doi.or/10.1017/S0031182010000089
- Montalvo AM, Fraga J, El Safi S, Gramiccia M, Jaffe CL, Dujardin JC, et al. Direct Leishmania species typing in Old World clinical samples: Evaluation of 3 sensitive methods based on the heat-shock protein 70 gene. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;80:35-9. https://doi.or/10.1016/j.diagmicrobio.2014.05.012
- Cruz-Barrera ML, Ovalle-Bracho C, Ortegon-Vergara V, Pérez-Franco JE, Echeverry MC. Improving Leishmania species identification in different types of samples from cutaneous lesions. J Clin Microbiol. 2015;53:1339-41. https://doi.or/10.1128/JCM.02955-14
- 23. Bangdiwala SI, Haedo AS, Natal ML, Villaveces A. The agreement chart as an alternative to the receiver-operating characteristic curve for diagnostic tests. J Clin Epidemiol. 2008;61:866-74. https://doi.or/10.1016/j.jclinepi. 2008.04.002
- Simel DL, Samsa GP, Matchar DB. Likelihood ratios with confidence: Sample size estimation for diagnostic test studies. J Clin Epidemiol. 1991;44:763-70. https://doi.or/10. 1016/0895-4356(91)90128-V
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet. 2005;366:1561-77. https://doi.or/10. 1016/S0140-6736(05)67629-5

- Ponce C, Ponce E, Cruz A, Kreutzer R, McMahon-Pratt D, Neva F. Leishmania donovani chagasi: New clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras. Lancet. 1991:337:67-70.
- Kebede N, Oghumu S, Worku A, Hailu A, Varikuti S, Satoskar AR. Multilocus microsatellite signature and identification of specific molecular markers for *Leishmania* aethiopica. Parasit Vectors. 2013;6:160. https://doi.or/10. 1186/1756-3305-6-160
- Leelayoova S, Siripattanapipong S, Hitakarun A, Kato H, Tan-ariya P, Siriyasatien P, et al. Multilocus characterization and phylogenetic analysis of *Leishmania siamensis* isolated from autochthonous visceral leishmaniasis cases, southern Thailand. BMC Microbiol. 2013;13:60. https://doi.or/10.1186/1471-2180-13-60
- Bhattacharyya R, Das K, Sen S, Roy S, Majumder HK.
   Development of a genus specific primer set for detection of Leishmania parasites by polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett. 1996;135:195-200.
- Mathis A, Deplazes P. PCR and in vitro cultivation for detection of Leishmania spp. in diagnostic samples from humans and dogs. J Clin Microbiol. 1995;33:1145-9.
- Cavalcanti MD, Dantas-Torres F, de Albuquerque SDG, de Morais RC, de Brito ME, Otranto D, et al. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia)* braziliensis in animals and humans. Mol Cell Probes. 2013;27:122-8. https://doi.or/10.1016/j.mcp.2013.01.003
- 32. Liew M, Nelson L, Margraf R, Mitchell S, Erali M, Mao R, et al. Genotyping of human platelet antigens 1 to 6 and 15 by high-resolution amplicon melting and conventional hybridization probes. J Mol Diagn. 2006;8:97-104. https://doi.or/10.2353/jmoldx.2006.050053
- 33. Tsukayama P, Núñez JH, De Los Santos M, Soberón V, Lucas CM, Matlashewski G, et al. A FRET-Based Real-Time PCR assay to identify the main causal agents of New World tegumentary leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7;21956, https://doi.or/10.1371/journal.pntd.0001956
- 34. Chiaramonte MG, Zwirner NW, Caropresi SL, Taranto NJ, Malchiodi EL. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. human mixed infection. Am J Trop Med Hyg. 1996;54:271-3. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.54.271
- 35. Saldarriaga OA, Castellanos-González A, Porrozzi R, Baldeviano GC, Lescano AG, de Los Santos MB, et al. An innovative field-applicable molecular test to diagnose cutaneous *Leishmania viannia* spp. infections. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0004638. https://doi.or/10.1371/journal.pntd.0004638
- Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of Leishmania infantum DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. J Clin Microbiol. 2004;42:5249-55. https:// doi.or/10.1128/JCM.42.11.5249-5255.2004



**Figura suplementaria 1.** Geles representativos de algunos de los marcadores utilizados para diferenciar las tres especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*. MO1 y MO2: marcadores específicos para *L. major;* Pan02, Pan041, Pan17 y Pan19: marcadores específicos de *L. panamensis;* CN: control negativo; LM: ADN genómico de *L. major;* TC: *T. cruzi;* LP: *L. panamensis* 

### ARTÍCULO ORIGINAL

# Diversidad del ADN mitocondrial en restos óseos prehispánicos asociados al Templo del Sol en los Andes orientales colombianos

Andrea Casas-Vargas<sup>1</sup>, Liza M. Romero<sup>1</sup>, William Usaquén<sup>1</sup>, Sara Zea<sup>1</sup>, Margarita Silva<sup>2</sup>, Ignacio Briceño<sup>3,4</sup>, Alberto Gómez<sup>3</sup>, José Vicente Rodríguez<sup>5</sup>

- <sup>1</sup> Grupo de Genética de Poblaciones e Identificación, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
- <sup>2</sup> Museo Parque Arqueológico de Sogamoso, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Sogamoso, Colombia
- <sup>3</sup> Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia
- <sup>4</sup> Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia
- <sup>5</sup> Laboratorio de Antropología Física, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** El ADN antiguo que se extrae de los restos óseos humanos permite analizar la composición genética de las poblaciones precolombinas y determinar las dinámicas poblacionales que dieron origen a la diversidad de las poblaciones contemporáneas.

**Objetivo.** Determinar la diversidad genética y la relación con otras comunidades contemporáneas y antiguas de América, de los restos óseos asociados al Templo del Sol en Sogamoso, Colombia.

**Materiales y métodos.** Se analizaron 13 individuos pertenecientes al periodo precolombino muisca (siglos IX-XVI d. C.), provenientes de los alrededores del Templo del Sol en Sogamoso, Boyacá, Andes orientales colombianos. Se amplificó el ADN mitocondrial (ADNmt) y se determinaron los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) para los cuatro haplogrupos amerindios (A, B, C y D). Además, se amplificaron y analizaron los marcadores autosómicos, incluida la amelogenina, y los marcadores de los polimorfismos de repeticiones cortas en tándem (*Short Tandem Repeat*, STR) del cromosoma Y.

**Resultados.** El haplogrupo A fue el linaje mitocondrial más frecuente en esta población, seguido de los haplogrupos B y C; no se detectó el haplogrupo D. Los análisis de variación genética indicaron una diversidad semejante a la de las poblaciones pertenecientes a la familia lingüística chibcha, contemporánea en Colombia y Centroamérica. Se logró hacer la determinación molecular del sexo de los individuos estudiados y compararla con los datos osteológicos. Con una sola excepción, los datos bioantropológicos y moleculares concordaron.

**Conclusiones.** Estos resultados aportan nuevos elementos a la hipótesis del origen centroamericano de los grupos chibchas del altiplano cundiboyacense con base en marcadores genéticos, y permitieron establecer el sexo y las relaciones de parentesco.

Palabras clave: ADN; ADN mitocondrial; amelogenina; cromosoma Y; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3377

### Mitochondrial DNA diversity in prehispanic bone remains on the eastern Colombian Andes

**Introduction:** DNA extracted from ancient human bones allows to analyze the genetic makeup of pre-Columbian populations and to determine the dynamics that gave rise to the diversity of contemporary populations.

**Objective:** To determine the genetic diversity of skeletal remains associated with the *Templo del Sol* (Sun Temple) and their relationship with other contemporary and ancient communities of America.

**Materials and methods:** We analyzed 13 individuals belonging to the pre-Columbian Muisca Period (IX-XVI centuries AD) from the vicinities of the *Templo del Sol* (Sun Temple) (Sogamoso, Boyacá) in

### Contribución de los autores:

Andrea Casas-Vargas: obtención de las muestras, análisis estadístico y análisis de resultados

Liza Romero: extracción de ADN y análisis molecular

William Usaquén: obtención de las muestras, análisis de datos y discusión

Sara Zea: cálculos estadísticos de paternidad

Margarita Silva: obtención de las muestras

Ignacio Briceño: análisis de resultados y discusión

Alberto Gómez y José Vicente Rodríguez: diseño y supervisión del estudio, contextualización bioantropológica y arqueológica, análisis de datos y discusión

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

the eastern Colombian Andes. Mitochondrial DNA was amplified and RFLPs were performed in order to type the four traditional Amerindian haplogroups (A, B, C and D). In addition, autosomal markers including amelogenin and Y-chromosome STRs were amplified.

**Results:** Among the observed mitochondrial lineages, haplogroup A was the most frequent, followed by haplogroups B and C; no evidence of haplogroup D was found. The genetic variation analysis indicated a similar diversity of pre-Columbian

Muiscas to that of contemporary populations belonging to the Chibcha linguistic family from Colombia and Central America. Molecular sexing was accomplished and it was compared to osteological data. With only one exception, anthropological and molecular data were consistent.

**Conclusions:** Our results contribute new genetic elements supporting the hypothesis of Central American origin of the Chibcha groups of the Cundiboyacense plateau, and allowed sex typing and kinship evaluations.

**Key words:** DNA; DNA, mitocondrial; amelogenin; Y chromosome; Colombia. doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3377

El estudio de la dinámica del poblamiento americano ha sido de gran interés para los investigadores por su utilidad para establecer las rutas de entrada al continente. La mayoría de los estudios genéticos se han basado principalmente en marcadores uniparentales, como el ADN mitocondrial (ADNmt) (1-3). Los genes mitocondriales se heredan exclusivamente por línea materna, y se asume que la recombinación es nula; además, son muy polimorfos, con una tasa de mutación más alta que la del ADN nuclear, lo cual resulta en una mayor resolución en escalas amplias de tiempo (4,5). Estas características permiten evaluar la relación genética entre individuos y poblaciones diferentes.

En las poblaciones nativas americanas se han descrito cinco haplogrupos mitocondriales principales: A, B, C, D y X, este último circunscrito únicamente a Norteamérica. Estos linajes se caracterizan por una o más sustituciones exclusivas que los distinguen de otros haplogrupos en el mundo (6). Asimismo, los marcadores mitocondriales han permitido hacer inferencias sobre el origen y el tiempo de divergencia de la población ancestral, y establecer la presentación de eventos particulares, tales como cuellos de botella, efectos fundadores o deriva génica (7,8).

En estudios previos, los haplogrupos de ADNmt se caracterizaron mediante las enzimas de restricción, de la siguiente manera: el haplogrupo A presenta la particularidad de un sitio de restricción de la enzima *Haelll* en la posición 663; el haplogrupo B,

Correspondencia:

Andrea Casas-Vargas, Grupo de Genética de Poblaciones e Identificación, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 N° 45-03, edificio 426, oficina 101, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: (571) 316 5000, extensión 11635 lacasasy@unal.edu.co

Recibido: 29/07/16; aceptado: 01/03/17

la deleción de 9 pb en COII/tARNIys; el haplogrupo C, la pérdida del sitio de *HincII* en la posición 13.259 pb, y el haplogrupo D se caracteriza por la pérdida del sitio de restricción *AluI* en la posición 5.176 (9-12).

La mayoría de los estudios poblacionales de América se han realizado en comunidades contemporáneas. Sin embargo, los estudios en poblaciones precolombinas se han incrementado en el continente y han permitido conocer los diferentes procesos locales y regionales de microevolución mediante el uso de los métodos paleogenéticos (2,13,14).

A pesar de que Colombia presenta una gran diversidad de evidencias arqueológicas, los estudios sobre la diversidad genética de las comunidades prehispánicas son muy escasos. Una de las zonas que ha permitido evidenciar los primeros asentamientos humanos en Colombia corresponde a los Andes orientales, específicamente el altiplano cundiboyacense, donde se han planteado diferentes hipótesis de poblamiento.

Varios investigadores concuerdan en que los diferentes periodos en que las poblaciones humanas ocuparon esta cordillera en tiempos precolombinos. son tres: precerámico (hasta el segundo milenio a. C.); formativo o Herrera (primer milenio a. C. a siglo VIII d.C.), y muisca o de comunidades pertenecientes a la familia lingüística chibcha (siglos IX-XVI d.C.). Estos períodos de poblamiento, según algunos autores, tienen orígenes diferentes producto de varias oleadas migratorias y de procesos estocásticos y adaptativos durante los cuales se desplazaron o absorbieron los grupos antecesores (15,16). Por el contrario, en los estudios bioantropológicos se ha sugerido que la población de esta región se remonta al periodo precerámico y que, posiblemente, hubo continuidad de linajes a partir de este tiempo hasta el periodo muisca, y se ha evidenciado que no se presentaron procesos migratorios masivos tardíos de pueblos foráneos, sino procesos de microevolución (17).

En el Museo Arqueológico de Sogamoso se encuentra una de las más grandes colecciones de restos óseos precolombinos provenientes de varios sitios de Boyacá, excavados en el transcurso de 50 años de investigaciones del profesor Eliécer Silva Celis. En esta colección, se encontraron individuos provenientes del municipio de Floresta con características morfológicas de paleoamericanos (dolicocéfalos) y con procesos de mineralización que evidencian una gran antigüedad y han sido datados en 7.950 ± 40 antes del presente (AP), tiempo calibrado entre 7.040 y 6.680 a. C. (beta-299693) (17).

En los restos provenientes del Templo del Sol de Sogamoso se han obtenido dos dataciones: la primera, de 310 años d. C., proveniente de maíz carbonizado asociado a los enterramientos, y la segunda, de hueso humano datado en 190 ± 40 años d. C. (calibrada entre 155 y 390) (beta-129230), es decir, 1.826 ± 40 AP, lo cual sugiere que el poblamiento de la zona en la que se halló esta estructura ritual presenta actividad humana por lo menos desde el periodo formativo (18).

En la última década, se han empleado herramientas genéticas que permiten inferir los procesos evolutivos en el tiempo real en el que sucedieron, tales como los estudios en ADN antiguo (ADNa). En Colombia, se han hecho varios estudios con ADN mitocondrial (ADNmt) de restos precolombinos de varios grupos étnicos de periodos arqueológicos diferentes (precerámico; formativo o Herrera; muisca o chibcha) y, principalmente, los correspondientes al periodo chibcha (guane, muisca, lache, chitarero). Al comparar los datos genéticos de los tres periodos arqueológicos, se ha evidenciado una continuidad genética en estas poblaciones de la Cordillera Oriental (19-22).

El propósito del presente estudio fue analizar genéticamente muestras provenientes de los alrededores del Templo del Sol en Sogamoso, el cual hacía parte de uno de los principales centros religiosos muiscas pertenecientes a la confederación del Sugamuxi (figura 1) (16,17). En el estudio, se analizaron 13 muestras de restos óseos antiguos encontrados en los alrededores de dicho templo, con el fin de determinar su diversidad genética y su relación con otras comunidades colombianas, así como su posible origen poblacional.

### Materiales y métodos

### Muestras

La colección del profesor Eliécer Silva del Museo Arqueológico de Sogamoso incluye una amplia muestra ósea proveniente de varias regiones de Boyacá. A pesar de no contar con un contexto funerario sistemático de estos restos, en estudios previos se han reportado análisis bioantropológicos de la colección orientados a establecer su variabilidad biológica y las prácticas funerarias asociadas (18), en los cuales se pudo determinar el sexo y la edad de cada individuo, empleando los estándares internacionales (18).

De esta colección se seleccionaron 13 individuos adultos, de los cuales se obtuvieron muestras de dientes y huesos largos. Los individuos, cuyos restos se excavaron en la vereda de Moniquirá, en los alrededores del Templo del Sol, se clasificaron según el periodo arqueológico al que pertenecían (cuadro 1), es decir, el periodo muisca, con base en el material cerámico asociado característico de este periodo.

### Precauciones para evitar la contaminación

Para garantizar la fidelidad de los resultados, se adoptaron los criterios recomendados para los análisis en ADN antiguo (ADNa) por Cooper, et al., y por Gilbert, et al. (23,24), para evitar la contaminación.



**Figura 1.** Mapa de Colombia con la localización del territorio ocupado por la comunidad muisca en el tiempo de la conquista española

Cuadro 1. Descripción de los individuos analizados

Individuo	Cementerio arqueológico	Edad antropológica (años)	Sexo antropológico	Biotipo	Cronología
SM27	MAS*	Adulto (40-50)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM30	MAS*	Adulto (40-50)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM31	MAS*	Adulto (40-50)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM39	MAS*	Adulto (30-40)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM43	MAS*	Desconocida	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM44	MAS*	Adulto (40-50)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM47	MAS*	Adulto (40-50)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM50	MAS*	Adulto (40-50)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM61	MAS*	Desconocida	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM67	MAS*	Adulto (30-40)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM68	MAS*	Adulto (50-60)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM104	MAS*	Desconocida	Masculino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM109	MAS*	Adulto (40-50)	Masculino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.

<sup>\*</sup> MAS: Museo Arqueológico de Sogamoso, Templo del Sol

La extracción y la amplificación del ADNa de los huesos se hicieron en un laboratorio exclusivo para dicho análisis en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, donde se dispone de áreas separadas para la extracción y la amplificación del ADN.

Antes de usar cada área, se hacía una limpieza con hipoclorito de sodio al 5 % y se irradiaba con luz ultravioleta durante toda la noche, en tanto que las cabinas de flujo se irradiaban durante una hora antes de su uso. El material (pipetas, material de plástico, anaqueles, guantes, batas, tapabocas y gorros) se irradiaba con luz ultravioleta durante una hora. El personal que realizaba el procedimiento de extracción empleaba traje especial desechable (tipo Tivek®), con el fin de cubrir todas las partes del cuerpo y evitar la contaminación.

Para detectar la posible contaminación con ADN moderno, se realizaban controles negativos en cada proceso (extracción, amplificación). Además, se hicieron múltiples extracciones y amplificaciones, con el fin de confirmar cada resultado. Asimismo, los investigadores involucrados en los procesos fueron tipificados.

### Aislamiento y cuantificación del ADN

La descontaminación de las muestras esqueléticas se hizo removiendo completamente la capa externa del hueso con un 'mototool' DREMEL® sobre una superficie estéril, procedimiento que no es necesario en las piezas dentales. Posteriormente, las muestras se lavaron con hipoclorito al 5 % durante 10 minutos y con etanol al 70 % durante 5 minutos; por último, se expusieron a luz ultravioleta por cada uno de los lados durante 15 minutos. A continuación.

se obtuvieron en promedio dos gramos de material pulverizado de hueso o diente, dependiendo del caso, usando un molino MN400 de Restsh®.

Aproximadamente, un gramo del material pulverizado se incubó a 56 °C durante 18 horas en una solución de 15 ml que contenía EDTA 0,5 M, N-Lauroilsarcosina al 1 %, y proteinasa-K (20 mg/ml). Posteriormente, se procedió extraer el ADN empleando el estuche comercial Qiaquick PCR Purification® (Qiagen), según las recomendaciones del fabricante y las modificaciones introducidas por la *International Commission on Missing Persons*, ICMP (25,26).

Este proceso se repitió dos veces con algunas de las muestras escogidas al azar y en momentos separados, para confirmar los resultados. Los aislamientos de ADN obtenidos se cuantificaron empleando el fluorómetro Qubit 2.0® de Invitrogen, según las recomendaciones del fabricante.

# Análisis de haplogrupos de ADNmt mediante PCR-RFLP

Las muestras se amplificaron mediante PCR para cuatro fragmentos de tamaños entre los 102 y 182 pb (cuadro 2). En la amplificación se utilizó la mezcla maestra GoTaqHot Start® de ADN polimerasa (Qiagen) 2X, 1X de potenciador (Epicentre), 100 µg de albúmina de suero bovino (BSA, Roche), y 0,8 µM de cada cebador.

El programa de PCR utilizado incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 15 minutos, 50 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, y un anillamiento de 45 segundos a una temperatura entre 55 y 58 °C según los iniciadores utilizados (cuadro 2) (11,12,27); además, una extensión a 72 °C durante 45 segundos, y otra final a 72 °C durante 3 minutos.

Cuadro 2. Cebadores o iniciadores para la extracción de ADN mitocondrial

Marcador o región blanco	Secuencia	Temperatura de anillamiento	Referencia
mtDNA haplogrupo A	606-626/ACACTGAAAATGTTTAGACGG	55 °C	(11)
(+ HaeIII 663)	689–708/GGGGATGCTTGCATGTGTAA	00 0	(11)
mtDNA haplogrupo B	8.196-8.214/ACAGTTTCATGCCCATCGTC	54 °C	(27)
(deleción 9 pb)	8.316-8.297/ ATGCTAAGTTAGCTTTACAG	54 C	(21)
mtDNA haplogrupo C	13.237-13.256/ATCGTAGCCTTCTCCACTTC	EE 0C	(40)
(+ Alul 13262)	13.397-13.419/TCCTCCTATTTTTCGAATATCTT	55 °C	(12)
mtDNA haplogrupo D	5.101-5.120/TAACTACTACCGCATTCCTA	55.00	(07)
(– <i>Alul</i> 5176)	5.149-5.129/ AAAGCCGGTTAGCGGGGCA	55 °C	(27)

Los productos amplificados se analizaron mediante la digestión de enzimas de restricción. Para establecer el haplogrupo A, se empleó la enzima de restricción *HaellI*, cuyo sitio de restricción se localiza en la posición 663; el haplogrupo B presenta la deleción de 9 pb en COII/tARNIys; el haplogrupo C, la pérdida del sitio de *HincII* en la posición de 13.259 pb, y el haplogrupo D se caracteriza por la pérdida del sitio de restricción *AluI* en la posición 5.176 (9-12). Los productos de las digestiones se analizaron en geles de agarosa al 2 %. La deleción de 9 pb, característica del haplogrupo B, se evidenció en gel de poliacrilamida.

# Amplificación del ADN para marcadores autosómicos y amelogenina

La amplificación se hizo con el estuche comercial multiplex AmpFiSTR SEfiler™ (Applied-Biosystems), el cual cuenta con 11 marcadores de STR autosómicos (D2S1338, D3S1358, D8S1179, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, FGA, SE33, TH01, vWA) y el marcador sexual amelogenina.

En un volumen final de 25 µl, se mezclaron los siguientes componentes: mezcla de reacción para PCR (AmpFiSTR SEfiler™ mix: MgCl₂, dNTP, 10 µl de albúmina de suero bovino en solución tampón con azida de sodio al 0,05 %; set de iniciadores (hacia adelante e inversos), 5 µl; 0,5 µl de enzima de ADN polimerasa (Amplitaq Gold DNA Polimerase 5 U/µl™); 5 µl de ADN (1,0-2,5 ng/µl), y 4,5 µl de agua destilada desionizada. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Thermal Cycler PCR System 2720® de Applied-Biosystems, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### Análisis de filiación

Para establecer las relaciones de parentesco entre todos los individuos, se usaron los análisis estadísticos empleados por el programa Familias, versión 3.0 (28). Todos los cálculos se basaron en las frecuencias alélicas de la población de los Andes colombianos (29).

# Amplificación del ADN para marcadores del cromosoma Y

El estuche AmpFISTR Yfiler PCR Amplification® (Applied Biosystems) se usó para amplificar 17 *loci* de STR (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385ab, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635 y GATA H4). Las condiciones de amplificación se ajustaron a las instrucciones del fabricante.

### Tipificación de los polimorfismos del ADN

Se utilizó un analizador genético ABI PRISM 310® (Applied-Biosystems) para la tipificación molecular, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se empleó el programa GeneMapper ID®, versión 3.2, el cual analiza el estándar de tamaño de control interno con el GeneScan-500 LIZ® en cada muestra y en la escalera alélica, para garantizar la precisión en cada inyección del capilar.

La asignación alélica se hizo por comparación de los fragmentos obtenidos en pares de bases para cada pico del alelo de las muestras analizadas, con los picos de la escalera alélica provista por la casa comercial Applied-Biosystems para los estuches AmpFiSTR SEfiler® y AmpFiSTR1 Y-filerTM Yfiler® (Applied-Biosystems, Foster City, CA).

### Análisis de datos

Con el fin de elucidar la relación biológica entre los individuos precolombinos muiscas y 43 comunidades nativas americanas contemporáneas, y comparar cuatro poblaciones precolombinas antiguas (3,19-22,27,30-47) (cuadro 3), se calculó la frecuencia de los haplogrupos por conteo directo.

La diversidad genética se calculó como (n/(n-1))  $(1-\Sigma pi2)$ , donde n es el tamaño de la muestra y pi es la frecuencia del haplogrupo estimada para cada haplogrupo i (48).

Las distancias genéticas se estimaron con base en las frecuencias de cada haplogrupo del ADNmt, calculando los datos del índice de fijación ( $F_{S7}$ ) con el programa Arlequin® (49).

Los datos de las frecuencias de los haplogrupos de ADNmt de otras poblaciones americanas contemporáneas y actuales, se obtuvieron de las reportadas en otros trabajos (3,19 20,22,27,30-47) (cuadro 3).

Se compararon las poblaciones por medio del análisis de correspondencias múltiples y el escalamiento multidimensional basado en los datos del  $F_{ST}$  con el programa MVSP®, versión 3.1(50).

### Resultados

### ADN mitocondrial

Las 13 muestras pertenecientes al periodo muisca presentaron los siguientes haplogrupos: nueve individuos presentaron el sitio de restricción +*Haelll* 643 y se clasificaron en el haplogrupo A; tres presentaron la deleción de 9 pb en COII/tARNlys, característica del haplogrupo B, y en una muestra se evidenció el sitio de restricción +*Alul* 13.262 correspondiente al haplogrupo C (34). Se encontró una elevada frecuencia del haplogrupo A (69 %),

Cuadro 3. Distribución de frecuencias de los haplogrupos de ADN mitocondrial en América ordenada de mayor a menor diversidad poblacional

Población <sup>a</sup>	n	Α	В	С	D	Otro	h	Ranking h	Referencia
Chibcha COL	15	0,40	0,13	0,27	0,13	0,07	0,78095	1	(41)
Cubeo COL	24	0,33	0,08	0,29	0,25	0,04	0,76449	2	(41)
Páez 2 <sup>COL</sup>	36	0,28	0,08	0,28	0,33	0,03	0,74762	3	(41)
Mapuche SA	39	0,15	0,38	0,21	0,26	0,00	0,73954	4	(43)
Desano COL	20	0,15	0,15	0,45	0,25	0,00	0,72632	5	(41)
Curripaco COL	22	0,05	0,41	0,36	0,14	0,05	0,70996	6	(41)
Wayuu <sup>COL</sup>	30	0,27	0,27	0,43	0,00	0,03	0,69195	7	(31,38,40)
Guane COL-ANT	17	0,35	0,41	0,00	0,24	0,00	0,69118	8	(40)
Waunana COL	40	0,05	0,47	0,28	0,18	0,03	0,68205	9	(27)
Ingano COL	48	0,40	0,35	0,23	0,02	0,00	0,67908	10	(41)
Yungay SA	20	0,05	0,50	0,25	0,20	0,00	0,67895	11	(39)
Tule-Cuna col	30	0,50	0,27	0,20	0,00	0,03	0,65977	12	(27,33)
Tucano <sup>COL</sup>	14	0,07	0,21	0,07	0,57	0,07	0,65934	13	(41)
Embera COL	21	0,10	0,52	0,29	0,10	0,00	0,65714	14	(41)
Antioquia COL	38	0,47	0,26	0,00	0,26	0,00	0,65434	15	(3)
Maya <sup>CA</sup>	27	0,53	0,23	0,16	0,08	0,00	0,65231	16	(33)
Embera COL	21	0,34	0,49	0,07	0,10	0,00	0,64737	17	(27)
Tatuyo <sup>coL</sup>	10	0,40	0,00	0,50	0,10	0,00	0,64444	18	(41)
Zenu COL	34	0,15	0,32	0,50	0,03	0,00	0,64171	19	(27)
Agroalfarero COL-ANT	24	0,54	0,25	0,17	0,04	0,00	0,64130	20	(19,20,22)
Puinave COL	61	0,08	0,51	0,33	0,07	0,02	0,63333	21	(41)
Quechua SA	23	0,09	0,57	0,30	0,04	0,00	0,60474	22	(44)
Yanomami SA	53	0,00	0,09	0,58	0,28	0,05	0,59259	23	(34)
Zoro SA	29	0,21	0,00	0,14	0,62	0,03	0,57143	24	(45)
Ciboney CA	15	0,07	0,00	0,60	0,33	0,00	0,56190	25	(36)
Cauca col	60	0,19	0,08	0,63	80,0	0,02	0,56045	26	(3)
Páez 1 <sup>COL</sup>	31	0,58	0,06	0,36	0,00	0,00	0,55054	27	(27)
Guane-Butar COL	33	0,12	0,64	0,00	0,24	0,00	0,53788	28	(27,30)
Muisca COL-ANT	13	0,69	0,23	0,08	0,00	0,00	0,50000	29	PS
Boruca CA	14	0,21	0,72	0,00	0,07	0.00	0,47253	30	(34)
Huetar CA	27	0,70	0,04	0,00	0,26	0,00	0,45299	31	(46)
Ngöbe <sup>CA</sup>	46	0,67	0,33	0,00	0,00	0,00	0,44928	32	(35)
Guambiano COL	80	0,06	0,07	0,74	0,13	0,00	0,43639	33	(3,27,41)
Arsario <sup>COL</sup>	28	0,71	0,00	0,29	0,00	0,00	0,42328	34	(38)
Kuna <sup>col</sup>	63	0,71	0,29	0,00	0,00	0,00	0,41475	35	(47)
Tainos CA	19	0,00	0,00	0,79	0,21	0,00	0,35088	36	(36)
Kogui <sup>COL</sup>	21	0,81	0,00	0,19	0,00	0,00	0,32381	37	(32,38)
Xavante SA	24	0,17	0,83	0,00	0,00	0,00	0,28986	38	(45)
Arhuaco <sup>COL</sup>	21	0,90	0,05	0,05	0,00	0,00	0,18571	39	(41)
ljka <sup>col</sup>	31	0,90	0.04	0,06	0,00	0,00	0,18495	40	(38)
Chimila <sup>COL</sup>	56	0,90	0,02	0,02	0,04	0,02	0,17441	41	(27,41)

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Ubicación geográfica: (COL) Colombia; (COL-ANT) Colombia-Antiguas; (CA) Centroamérica; (SA) Suramérica h: diversidad de haplogrupo

seguida por la del haplogrupo B (23 %), una baja frecuencia del haplogrupo C (8 %) y ausencia del haplogrupo D.

Los índices de diversidad genética (cuadro 3) revelaron que la diversidad del grupo de individuos muiscas era mayor a la encontrada en 12 poblaciones de 41 grupos analizados integrados por más de 10 individuos. De estas, solo tres comunidades correspondían a reportes de grupos precolombinos con diversidades entre 0,5 y 0,69 (muisca, 0,5; agroalfarero, 0,64, y guane, 0,69).

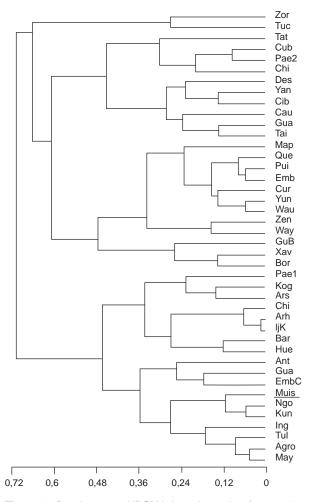
Al construir un dendrograma UPGMA basado en las frecuencias de los haplogrupos de las diferentes poblaciones amerindias de Centroamérica, Suramérica y Colombia (figura 2), y analizar el total de poblaciones, incluidas las de Centroamérica v Suramérica, así como poblaciones colombianas contemporáneas y antiguas, se observó que los individuos muiscas estudiados (Muis) se encontraban en un mismo agrupamiento con las poblaciones ngöbe y kuna de Centroamérica (figura 2). Al hacer este mismo análisis solo con las poblaciones colombianas, se observó un agrupamiento con las poblaciones ingano (Región Amazónica), agroalfarero (población precolombina de los Andes orientales) y tule-cuna (istmo de Panamá) (figura 3).

Se construyó, asimismo, una matriz de distancias a partir de datos del  $F_{ST}$  y se analizaron los componentes principales (PCA), observándose grupos conformados por los individuos del estudio (Muis), y por poblaciones arhuaco (Arh), agroalfarero (Agro), y embera-Antioquia (Ant) (figura 4). Otros grupos fuertemente relacionados, tanto genética como geográficamente, fueron los de la Sierra Nevada de Santa Marta (ijka, kogui, arsario).

### Marcadores autosómicos y amelogenina

Se tipificaron los marcadores autosómicos de las 13 muestras de huesos analizadas con el estuche comercial multiplex AmpFiSTR SEfiler™ (Applied-Biosystems). Se obtuvo el perfil completo de dos muestras y siete perfiles parciales; en las seis restantes no se obtuvo amplificación debido al estado de degradación del ADN, lo cual es característico de las muestras antiguas (cuadro 4).

El análisis estadístico para establecer la relación de parentesco entre los individuos analizados, reveló que no estaban estrechamente emparentados. En efecto, al hacer la comparación entre las muestras, no se observaron perfiles genéticos relacionados, es decir, con algún grado de parentesco, y sí,



**Figura 2.** Dendrograma UPGMA basado en las frecuencias de haplogrupo de las diferentes poblaciones amerindias de Centroamérica, Suramérica y Colombia.

Los nombres clave de las abreviaturas están indicados en paréntesis: Chib (Chibcha), Cub (Cubeo), Pae2 (Páez 2), Map (Mapuche), Des (Desano), Cur (Curripaco), Way (Wayuu), Gua (Guane), Wau (Waunana), Ing (Ingano), Yun (Yungay), Tul (Tule-Cuna), Tuc (Tucano), Emb (Embera), Ant (Antioquia), May (Maya), Emb (Embera), Tat (Tatuyo), Zen (Zenu), Agro (Agroalfarero), Pui (Puinave), Que (Quecua), Yan (Yanomami), Zor (Zoro), Cib (Ciboney), Cau (Cauca), Pae1 (Páez 1), GuB (Guane-Butar), Muis (Muisca), Bor (Boruca), Hue (Huetar), Ngö (Ngöbe), Gua (Guambiano), Ars (Arsario), Kun (Kuna), Tai (Tainos), Kog (Kogui), Xav (Xavante), Arh (Arhuaco), Ijk (Ijka), Chi (Chimila).

exclusiones en algunos sistemas, en tanto que en los análisis de razón de verosimilitud (*likelihood ratio*, LR) asumiendo las hipótesis de la probabilidad de filiación padre-hijo, madre-hijo y hermanos, no se obtuvieron datos significativos.

Mediante la determinación del sexo con el marcador de la amelogenina, se comparó la evidencia genética molecular con los datos arqueológicos según sus características morfológicas (cuadro 5).

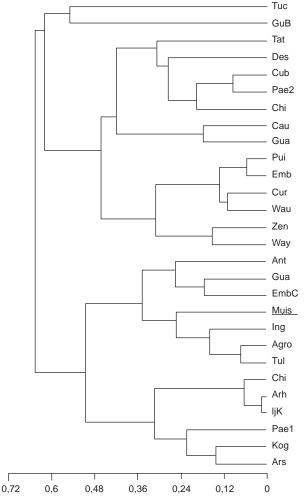


Figura 3. Dendrograma UPGMA basado en las frecuencias de haplogrupo de las diferentes poblaciones amerindias de Colombia. Los nombres claves de las abreviaciones están indicados en paréntesis: Chib (Chibcha), Cub (Cubeo), Pae2 (Páez2), Des (Desano), Cur (Curripaco), Way (Wayuu), Gua (Guane), Wau (Waunana), Ing (Ingano), Yun (Yungay), Tul (Tule-Cuna), Tuc (Tucano), Emb (Embera), Ant (Antioquia), Tat (Tatuyo), Zen (Zenu), Agro (Agroalfarero), Pui (Puinave), Cau (Cauca), Pae1 (Páez 1), GuB (Guane-Butar), Muis (Muisca), Gua (Guambiano), Ars (Arsario), Kog (Kogui), Xav (Xavante), Arh (Arhuaco), Ijk (Ijka), Chi (Chimila).

Los datos genéticos y antropológicos concordaron, excepto en la muestra SM 68, identificada antropológicamente como "adulto femenino", aunque se tipificó genéticamente en el presente trabajo como perteneciente al sexo masculino, es decir, XY (cuadro 5).

### Cromosoma Y

En las cuatro muestras asignadas al sexo masculino mediante el marcador amelogenina, se pudieron amplificar los marcadores del cromosoma Y solo en dos de las muestras y con perfiles parciales. Al comparar los perfiles, en seis casos no hubo concordancia. En consecuencia, se trataba de individuos no relacionados directamente en sus linajes paternos (cuadro 6).

### Discusión

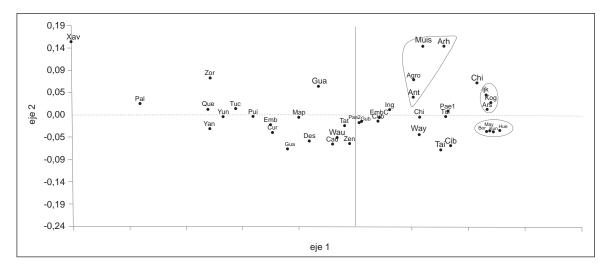
### ADN mitocondrial

En este estudio se hicieron los análisis genéticos del ADNmt de restos óseos antiguos provenientes de los Andes orientales colombianos, específicamente del departamento de Boyacá, municipio de Sogamoso, donde se encuentra uno de los grandes cementerios muiscas en los alrededores del Templo del Sol. Según dos dataciones obtenidas por radiocarbono, la ocupación de este territorio se habría iniciado durante el periodo Herrera o formativo. Infortunadamente, no existe una información más detallada de las excavaciones de la década de 1940 que permita diferenciar las ocupaciones de los periodos formativo y muisca (17,51,52).

Los resultados de este estudio constituyen información adicional sobre los haplogrupos de ADNmt de estos individuos precolombinos que complementan los estudios previos (19-22,40). El haplogrupo A presenta mayores frecuencias, entre 40 y 90 %, en Norteamérica y Centroamérica; asimismo, en Colombia se observa un gradiente en las frecuencias de este haplogrupo, con altas frecuencias en poblaciones del norte, como las de la Sierra Nevada de Santa Marta (70-90 %), en tanto que en el sur del país se presentan bajas frecuencias (7-10 %).

De las 13 muestras analizadas y clasificadas en el periodo muisca, se encontró una alta frecuencia del haplogrupo A (69 %), seguido por el haplogrupo B (23 %), con una baja frecuencia del haplogrupo C (8 %) y ausencia del haplogrupo D. El patrón de distribución de frecuencias de la población precolombina muisca de Sogamoso es muy similar al patrón encontrado en otros estudios en comunidades precolombinas pertenecientes al periodo muisca, en los cuales se ha reportado una alta frecuencia del haplogrupo A, seguido del B, y una baia frecuencia de los haplogrupos C y D (54, 25, 17 y 4 %, respectivamente). Otra población contemporánea similar es la tule-cuna, del occidente del país, en la que no se ha encontrada el haplogrupo D (cuadro 3).

Por otro lado, algunos investigadores han observado que las poblaciones de lengua chibcha presentan altas frecuencias del haplogrupo A, lo cual puede ser resultado de un flujo génico reciente; según



**Figura 4.** Análisis de los componentes principales (PCA) basado en datos del  $F_{ST}$  de poblaciones de Colombia, Centroamérica y Suramérica para haplogrupos de ADNmt.

Los nombres claves de las abreviaturas están indicados en paréntesis: Chib (Chibcha), Cub (Cubeo), Pae2 (Páez 2), Map (Mapuche), Des (Desano), Cur (Curripaco), Way (Wayuu), Gua (Guane), Wau (Waunana), Ing (Ingano), Yun (Yungay), Tul (Tule-Cuna), Tuc (Tucano), Emb (Embera), Ant (Antioquia), May (Maya), Emb (Embera), Tat (Tatuyo), Zen (Zenú), Agro (Agroalfarero), Pui (Puinave), Que (Quecua), Yan (Yanomami), Zor (Zoro), Cib (Ciboney), Cau (Cauca), Pae1 (Páez 1), GuB (Guane-Butar), Muis (Muisca), Bor (Boruca), Hue (Huetar), Ngö (Ngöbe), Gua (Guambiano), Ars (Arsario), Kun (Kuna), Tai (Tainos), Kog (Kogui), Xav (Xavante), Arh (Arhuaco), Ijk (Ijka), Chi (Chimila).

Cuadro 4. Resultados y perfiles de amplificación de STR autosómicos empleando el estuche AmpFiSTR SEfiler™

Individuo	SM27	SM31	SM39	SM43	SM44	SM47	SM68	SM104	SM109
D3S1358	16/18	14/15	15/18	15/16	16	16	15	15	15/16
VWA	14/16	16/17	а	а	16/19	15	16	а	16
D16S539	10/12	12	а	5	11/12	а	а	а	11/12
D2S1338	17	22/23	а	а	22	а	а	а	18
Amelogenina	X	X	Χ	Χ	X	Χ	X/Y	X/Y	X/Y
D8S1179	14	12/13	13	а	11/14	13	13/14	12/13	13
SE33	19/28.2	19/29.2	а	а	_a	а	а	а	14/17
D19S433	13/15	13.2/14	а	а	13/15	14/14.2	13.2/14	14/15	13/15
TH01	7/9	7	а	а	6/7	7/9	7	а	6/7
FGA	22/27	19/25	а	а	24/26	а	а	a	23/24
D21S11	31/31,2	30,2/32,2	а	а	28/33.2	30	30	a	28/32,2
D18S51	а	13/14	а	а	а	а	а	а	14/16

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Ausencia de resultado

varios trabajos preliminares, la presencia de los haplogrupos B y C podría representar una oleada migratoria anterior (21,40,53).

En estudios previos se ha observado que las poblaciones contemporáneas colombianas muestran una gran frecuencia de los haplogrupos A y C y baja frecuencia del haplogrupo D, sobre todo en las poblaciones del norte de Colombia (27,38,41,42).

Cuando se analizaron los componentes principales a partir de los datos del  $F_{ST}$ , se observó que en un mismo conjunto aparecían agrupadas las poblaciones arhuaco, agroalfarero y Antioquia (embera); estas comunidades pertenecen al grupo lingüístico

chibcha, lo cual respalda la hipótesis sobre el posible origen ancestral común de la población muisca, ya que se considera que esta comunidad prehispánica también habría pertenecido a este grupo lingüístico (17). Esta coincidencia es interesante, pues también se ha reportado en otros estudios en comunidades contemporáneas de la familia lingüística chibcha (38,41).

Por otro parte, la población denominada agroalfarera corresponde a un grupo de muestras precolombinas provenientes de diferentes zonas de los Andes orientales colombianos que fueron clasificadas en el último periodo precolombino

**Cuadro 5.** Comparación de los resultados del sexo molecular con respecto al sexo antropológico

Individuo	Edad antropológica (años)	Sexo molecular	Sexo antropológico
SM27	Adulto (40-50)	Femenino	Femenino
SM30	Adulto (40-50)	Femenino	Femenino
SM31	Adulto (40-50)	Femenino	Femenino
SM39	Adulto (30-40)	Femenino	Femenino
SM43	Desconocida	Femenino	Femenino
SM44	Adulto (40-50)	Femenino	Femenino
SM47	Adulto (40-50)	Femenino	Femenino
SM68	Adulto (50-60)	Masculino	Femenino
SM104	Desconocida	Masculino	Masculino
SM109	Adulto (40-50)	Masculino	Masculino

Cuadro 6. Resultados y perfiles de amplificación de STR del cromosoma Y con el estuche AmpFISTR Yfiler™

Individuo	SM68	SM109
DYS456	14	16
DYS3891	13	14
DYS390	24	24
DYS389II	а	a
DYS458	15	16
DYS19	a	a
DYS385	a	a
DYS393	15	13
DYS391	10	6
DYS439	а	a
DYS635	22	22
DYS392	а	a
GATA H4	11	12
DYS437	14	14
DYS438	а	a
DYS448	a	19

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Ausencia de resultado

correspondiente a los siglos IX-XVI d. C., y se caracterizaron por cacicazgos y una cultura agrícola (17). Las similitudes encontradas son, en todo caso, importantes, ya que se observó un patrón similar entre individuos pertenecientes al mismo periodo, lo cual demuestra que en las poblaciones precolombinas el haplogrupo A era el más frecuente, seguido por el haplogrupo B.

En los dendrogramas correspondientes, se evidenció que el patrón de distribución de haplogrupos también presentaba similitud con poblaciones de Centroamérica (ngöbe y kuna), lo cual corrobora el posible tronco común ancestral de las comunidades contemporáneas centroamericanas y las comunidades precolombinas de Colombia, tal y como se ha observado en otros estudios de poblaciones indígenas de Panamá (53) y la costa norte de Colombia (46).

Estos datos concordarían con los datos arqueológicos que han servido para determinar las sucesivas rutas del poblamiento colombiano, como se enumera a continuación.

Los primeros pobladores, que consistían en bandas trashumantes de cazadores recolectores, habrían atravesado el istmo de Panamá por la serranía del Darién a finales del pleistoceno, cuando no existía el bosque tropical sino llanuras.

Desde allí se habrían desplazado al interior del país por el occidente (Costa Pacífica, cordilleras Occidental, Central y valle del río Cauca), el centro (valle del río Magdalena, cordillera Oriental) y por el oriente (Llanos Orientales).

La región central de los Andes orientales pudo haber sido ocupada por pobladores provenientes de dos rutas: por el norte (valle de los ríos Magdalena, Sogamoso y Opón), se extendieron por los departamentos de Santander, Norte de Santander y Boyacá, y por el valle del río Bogotá, al sur, se dispersaron por la región del altiplano cundiboyacense (54).

## Marcadores autosómicos, amelogenina y cromosoma Y

El objetivo inicial al emplear el estuche comercial multiplex AmpFiSTR SEfiler™ (Applied-Biosystems) era, principalmente, amplificar la amelogenina para determinar el sexo de los individuos. Al obtener los resultados de las muestras, se lograron perfiles completos y, para los otros marcadores autosómicos, perfiles parciales. Además, el análisis de parentesco de las muestras obtenidas mediante el cálculo del LR no arrojó ninguna relación familiar. Lo mismo ocurrió cuando se analizaron los marcadores del cromosoma Y, con lo cual se obtuvieron dos perfiles parciales sin ninguna relación entre ellos.

Estos hallazgos son importantes a nivel arqueológico, y demuestran que estas metodologías mejoran los métodos de extracción al emplear estuches comerciales para marcadores autosómicos con fragmentos más cortos de amplificación, con lo que se logran perfiles completos en estas muestras antiguas. De esta manera, se podrían dilucidar las relaciones familiares y complementar las hipótesis arqueológicas basadas en contextos funerarios que sugieren posibles parentescos, tal y como ha ocurrido en estudios previos (55-57).

Con respecto a la amelogenina, los datos antropológicos y moleculares concordaron con una sola excepción. El individuo SM68 se clasificó antropológicamente como femenino, pero en la amplificación para el cromosoma Y se reclasificó como de sexo masculino. Así, estos resultados permiten contrastar y corregir la asignación de sexo basada exclusivamente en datos antropológicos. Al comparar los datos moleculares y antropológicos, ya se han observado inconsistencias en otros estudios con poblaciones antiguas (55,58).

Los datos del presente estudio subrayan la importancia de la contribución del ADN antiguo en los estudios arqueológicos, pues constituyen una primera aproximación a la distribución de los haplogrupos mitocondriales encontrados en la población muisca del Templo del Sol. Según estos resultados, es posible que estos pobladores precolombinos de los Andes orientales provinieran de Centroamérica después de atravesar el istmo de Panamá y se establecieran en el altiplano cundiboyacense, lo cual significa que comparten ancestros comunes con las poblaciones pertenecientes a la familia lingüística chibcha.

Los resultados también indican la utilidad de la determinación del sexo mediante métodos moleculares en aquellos casos en los cuales las evidencias antropológicas no sean suficientes, como es el caso de los restos óseos infantiles. Además, los perfiles de los marcadores autosómicos pueden arrojar luces sobre las hipótesis de los arqueólogos, principalmente en el caso de las hipótesis de parentesco, las cuales deben confirmarse mediante marcadores moleculares que abarquen regiones más informativas con respecto al ADNmt y permitan establecer los haplogrupos secundarios de esta población. Asimismo, es necesario ampliar el tamaño de la muestra e incorporar otros marcadores nucleares.

Con esta nueva información se podrán corroborar las hipótesis formuladas en el presente artículo y profundizar en el conocimiento de las rutas migratorias y las relaciones entre los grupos precolombinos que habitaron esta región.

### Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento especial al Museo Arqueológico de Sogamoso de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia por facilitar el acceso a las muestras que hicieron posible este trabajo, así como al Instituto Colombiano de Antropología e Historia, por autorizar el acceso a los restos óseos (N° ICAHN-132) en el marco del proyecto financiado por Colciencias (ref. 110156934771). La primera autora agradece a Colciencias la beca doctoral (Convocatoria 528) otorgada con este mismo propósito.

### Conflicto de intereses

Los autores declaramos que durante la realización de este estudio no tuvimos ningún conflicto de intereses que pudiera afectar los resultados.

### Financiación

Este trabajo fue financiado por Colciencias (ref. 110156934771) mediante la beca doctoral de la primera autora (Convocatoria 528), y con recursos propios del Instituto de Genética Humana de la Facultad de Medicina en la Pontificia Universidad Javeriana, de la Facultad de Medicina en la Universidad de la Sabana, así como del Grupo de Genética de Poblaciones e Identificación del Instituto de Genética y del Laboratorio de Antropología Física de la Universidad Nacional de Colombia.

### Referencias

- De Saint Pierre M, Gandini F, Perego U, Bodner M, Gómez-Carballa A, Corach D, et al. Arrival of Paleo-Indians to the southern cone of South America: New clues from mitogenomes. PLoS One. 2012;7:e51311. https://doi. org/10.1371/journal.pone.0051311
- Chatters JC, Kennett DJ, Asmerom Y, Kemp BM, Polyak V, Blank AN, et al. Late Pleistocene human skeleton and mtDNA link Paleoamericans and modern native Americans. Science. 2014;344:750-4. https://doi.org/10.1126/science. 1252619
- Xavier C, Builes JJ, Gomes V, Ospino JM, Aquino J, Parson W, et al. Admixture and genetic diversity distribution patterns of non-recombining lineages of native American ancestry in Colombian populations. PLoS One. 2015;10:e0120155. https://doi.org/10.1371/journal.pone. 0120155
- Pakendorf B, Stoneking M. Mitochondrial DNA and human evolution. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2005;6:165-83. https://doi.org/10.1146/annurev.genom.6.080604.162249
- Chen XJ, Butow RA. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. Nat Rev Genet. 2005;6:815-25. https://doi.org/10.1038/nrg1708
- O'Rourke DH, Raff JA. The human genetic history of the Americas: The final frontier. Curr Biol. 2010;20:R202-7. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.11.051
- Schurr TG, Sherry ST. Mitochondrial DNA and Y chromosome diversity and the peopling of the Americas: Evolutionary and demographic evidence. Am J Hum Biol. 2004;16:420-39. https://doi.org/10.1002/ajhb.20041
- Achilli A, Perego U, Lancioni H, Olivieri A, Gandini F, Hooshiar Kashani B, et al. Reconciling migration models to the Americas with the variation of North American native mitogenomes. Proc Natl Acad Sci USA. 2013;110:14308-13. https://doi.org/10.1073/pnas.1306290110
- Torroni A, Schurr G, Yang C, Williams RC, Schanfield MS, Troup GA, et al. Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. Genetics. 1992;130:153-62.

- Torroni A, Sukernik RI, Schurr TG, Starikorskaya YB, Cabell MF, Crawford MH, et al. mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans. Am J Hum Genet. 1993;53:591-608.
- Bolnick DA, Bonine HM, Mata-Míguez J, Kemp BM, Snow MH, Leblanc SA. Nondestructive sampling of human skeletal remains yields ancient nuclear and mitochondrial DNA. Am J Phys Anthropol. 2012;147:293-300. https://doi. org/10.1002/ajpa.21647
- Parr R, Carlyle SW, O'Rourke DH. Ancient DNA analysis of Fremont Amerindians of the Great Salt Lake wetlands. Am J Phys Anthr. 1996;99:507-18.
- García F, Moraga M, Vera S, Henríquez H, Llop E, Aspillaga E, et al. mtDNA microevolution in Southern Chile's archipelagos. Am J Phys Anthropol. 2006;129:473-81. https://doi.org/10.1002/ajpa.20297
- Fehren-Schmitz L, Warnberg O, Reindel M, Seidenberg V, Tomasto-Cagigao E, Isla-Cuadrado J, et al. Diachronic investigations of mitochondrial and Y-chromosomal genetic markers in pre-Columbian Andean highlanders from South Perú. Ann Hum Genet. 2011;75:266-83. https://doi. org/10.1111/j.1469-1809.2010.00620.x
- Lleras R. Diferentes oleadas de poblamiento en la prehistoria tardía de los Andes Orientales. Boletín Museo del Oro. 1995;38-39:3-11.
- Langebaek C. Mercados, poblamiento e integración étnica entre los Muiscas del siglo XVI. Bogotá: Banco de la República; 1987.
- Rodríguez JV. Los chibchas: hijos del sol, la luna y los Andes. Orígenes de su diversidad. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia: 2011.
- Buitrago LM, Rodríguez O. Estudio bioantropológico de la colección Eliécer Silva Celis, Museo Arqueológico de Sogamoso. En: Rodríguez JV, editor. Los Chibchas: adaptación y diversidad en los Andes Orientales de Colombia. Bogotá: Editora Guadalupe Ltda.; 1999. p. 217-36.
- 19. Fernández C. La arqueología molecular aplicada a la solución de problemas prehistoricos: análisis de ADN mitocondrial en momias y restos óseos prehispánicos (tesis). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 1999.
- Monsalve MV, Cárdenas F, Guhl F, Delaney AD, Devine DV. Phylogenetic analysis of mtDNA lineages in South American mummies. Ann Hum Genet. 1996;60:293-303. https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1996.tb01193.x
- 21. Silva A, Briceño I, Burgos J, Torres D, Villegas V, Gómez A, et al. Análisis de ADN mitocondrial en una muestra de restos óseos arcaicos del periodo Herrera en la sabana de Bogotá. Biomédica. 2008;28:569-77. https://doi.org/10.7705/biomedica.v28i4.62
- 22. Sánchez C. Secuenciación de ADN mitocondrial a partir de fragmentos óseos prehispánicos hallados en el sector de Candelaria La Nueva en Bogotá. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2007.
- Cooper A, Poinar HN. Ancient DNA: Do it right or not at all. Science. 2000;289:1139. https://doi.org/10.1126/ science.289.5482.1139b
- Gilbert MT, Hofreiter M, Barnes I. Assessing ancient DNA studies. Trends Ecol Evol. 2005;20:541-4. https://doi. org/10.1016/j.tree.2005.07.005

- 25. Huel R, Amory S, Bilic A, Vidovic S, Jasaragic E, Parsons T. DNA extraction from aged skeletal samples for STR typing by capillary electrophoresis. Methods Mol Biol. 2012;830:185-98. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-461-2 13
- Huffine E, Crews J, Kennedy B, Bomberger K, Zinbo A. Mass identification of persons missing from the break-up of the former Yugoslavia: Structure, function, and role of the International Commission on Missing Persons. Croat Med J. 2001;42:271-5.
- Keyeux G, Rodas C, Gelvez N, Carter D. Possible migration routes into South America deduced from mitochondrial DNA studies in Colombian Amerindian Populations. Hum Biol. 2002;74:211-33.
- Egeland T, Mostad P, Mevag B, Stenersen M. Beyond traditional paternity and identification cases. Selecting the most probable pedigree. Forensic Sci Int. 2000;110:47-59. https://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00147-X
- Paredes M, Galindo A, Bernal M, Ávila S, Andrade D, Vergara C, et al. Analysis of the CODIS autosomal STR loci in four main Colombian regions. Forensic Sci Int. 2003;14:67-73. https://doi.org/10.1016/S0379-0738(03)00271-8
- Shields GF, Schmiechen AM, Frazier BL, Redd A, Voevoda MI, Reed JK, et al. mtDNA sequences suggest a recent evolutionary divergence for Beringian and northern North American populations. Am J Hum Genet. 1993;53: 549-62.
- Ward RH, Redd A, Valencia D, Frazier B, Pääbo S. Genetic and linguistic differentiation in the Americas. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:10663-7.
- 32. Ward RH, Frazier BL, Dew-Jager K, Pääbo S. Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88:8720-4.
- 33. Schurr TG, Ballinger SW, Gan YY, Hodge JA, Merriwether DA, Lawrence DN, et al. Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages. Am J Hum Genet. 1990;46:613-23.
- 34. Torroni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, et al. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. Am J Hum Genet. 1993;53:563-90.
- Kolman CJ, Bermingham E, Cooke R, Ward RH, Arias TD, Guionneau-Sinclair F. Reduced mtDNA diversity in the Ngöbé Amerinds of Panamá. Genetics. 1995;140:275-83.
- Lalueza-Fox C, Calderón FL, Calafell F, Morera B, Bertranpetit J. MtDNA from extinct Tainos and the peopling of the Caribbean. Ann Hum Genet. 2001;65:137-51. https:// doi.org/10.1017/S0003480001008533
- Lalueza-Fox C, Sampietro ML, Gilbert MT, Castri L, Facchini F, Pettener D, et al. Unravelling migrations in the steppe: Mitochondrial DNA sequences from ancient central Asians. Proc Biol Sci. 2004;271:941-7. https://doi. org/10.1098/rspb.2004.2698
- Melton PE, Briceño I, Gómez A, Devor E, Bernal JE, Crawford MH. Biological relationship between Central and South American Chibchan speaking populations: Evidence from mtDNA. Am J Phys Anthropol. 2007;770:753-70. https://doi.org/10.1002/ajpa

- Lewis CM, Lizárraga B, Tito RY, López PW, Lannacone GC, Medina A, et al. Mitochondrial DNA and the peopling of South America. Hum Biol. 2007;79:159-78. https://doi. org/10.1353/hub.2007.0031
- 40. Casas-Vargas A, Gómez A, Briceño I, Díaz-Matallana M, Bernal JE, Rodríguez JV. High genetic diversity on a sample of pre-Columbian bone remains from Guane territories in northwestern Colombia. Am J Phys Anthropol. 2011;146:637-49. https://doi.org/10.1002/ajpa.21626
- 41. Usme-Romero S, Alonso M, Hernández-Cuervo H, Yunis EJ, Yunis JJ. Genetic differences between Chibcha and non-Chibcha speaking tribes based on mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups from 21 Amerindian tribes from Colombia. Genet Mol Biol. 2013;36:149-57. https://doi. org/10.1590/S1415-47572013005000011
- 42. Torres MM, Bravi CM, Bortolini MC, Duque C, Callegari-Jacques S, Ortiz D, et al. A revertant of the major founder native American haplogroup C common in populations from northern South America. Am J Hum Biol. 2006;18:59-65. https://doi.org/10.1002/ajhb.20461
- 43. Ginther C, Corach D, Penacino G, Rey J, Carnese F, Hutz M, et al. Genetic variation among the Mapuche indians from the Patagonian region of Argentina: Mitochondrial DNA sequence variation and allele frequencies of several nuclear genes. En: Peña S, Chakraborty R, Epplen J, Jeffreys A, editors. DNA finger- printing: State of the science. First edition. Basel: Birkhäuser; 1993. p. 211-9.
- 44. Wang S, Lewis CM, Jakobsson M, Ramachandran S, Ray N, Bedoya G, et al. Genetic variation and population structure in native Americans. PLoS Genet. 2007;3:e185. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030185
- 45. Ward R, Salzano F, Bonatto S, Hutz M, Coimbra JC, Santos R. Mitochondrial DNA polymorphism in three Brazilian tribes. Am J Hum Biol. 1996;8:317-23. https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6300(1996)8:3<317::AID-AJHB2>3.0.CO;2-X
- Santos M, Ward R, Barrantes R. mtDNA variation in the Chibcha Amerindian Huetar from Costa Rica. Hum Biol. 1994;66:963-77.
- Batista O, Kolman C, Bermingham E. Mitochondrial DNA diversity in the Kuna Amerinds of Panamá. Hum Mol Genet. 1995;4:921-9.

- 48. **Nei M.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 1978:89:583-90.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinform Online. 2005;1:47-50.
- Kovach W. MVSP A MultiVariate Statistical Package for Windows. ver. 3.1. Pentraeth, Wales, U.K. Kovack Computing Services; 2007.
- 51. Rodríguez JV. Craneometría de la población prehispánica de los Andes Orientales de Colombia: diversidad, adaptación y etnogénesis. Los Chibchas: adaptación y diversidad en los Andes Orientales de Colombia. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Colciencias; 2001. p. 250-310.
- Silva CE. Investigaciones arqueológicas en Villa de Leiva. Boletín del Museo del Oro. 1981;10:1-18.
- Perego U, Lancioni H, Tribaldos M, Angerhofer N, Ekins JE, Olivieri A, et al. Decrypting the mitochondrial gene pool of modern Panamanians. PLoS One. 2012;7:e38337. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038337
- Rodríguez JV. La diversidad poblacional de Colombia en el tiempo y el espacio. Rev Acad Colomb Cienc. 2007;31: 321-46.
- 55. Gamba C, Fernández E, Tirado M, Pastor F, Arroyo-Pardo E. Ancient nuclear DNA and kinship analysis: The case of a medieval burial in San Esteban Church in Cuéllar (Segovia, Central Spain). Am J Phys Anthropol. 2011;144:485-91. https://doi.org/10.1002/ajpa.21451
- 56. Bentley R, Layton R, Tehrani J. Kinship, marriage, and the genetics of past human dispersals wave of advance model. Hum Biol. 2009;81:159-80. https://doi.org/10.3378/027.081.0304
- Vanek D, Saskova L, Koch H. Kinship and Y-chromosome analysis of 7th century human remains: Novel DNA extraction and typing procedure for ancient material. Croat Med J. 2009;50:286-95. https://doi.org/10.3325/cmj.2009.50.286
- Bauer CM, Niederstätter H, McGlynn G, Stadler H, Parson W. Comparison of morphological and molecular genetic sextyping on mediaeval human skeletal remains. Forensic Sci Int Genet. 2013;7:581-6. https://doi.org/10.1016/j.fsigen. 2013.05.005.

### NOTA TÉCNICA

# Validación de una metodología analítica para determinar bifenilos policlorados en muestras de plasma sanguíneo

Boris Santiago Ávila, Carolina Ramírez

Grupo de Salud Ambiental y Laboral, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C, Colombia

**Introducción.** Los bifenilos policlorados se encuentran entre los cinco contaminantes orgánicos persistentes más tóxicos para los organismos vivos, según la *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) de los Estados Unidos.

**Objetivo.** Estandarizar y validar un método analítico para la determinación y cuantificación de los bifenilos policlorados indicadores en muestras de plasma sanguíneo, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

**Materiales y métodos.** Se fortificó un *pool* de plasma para hacer los ensayos en la matriz. Además, se utilizó el material de referencia NIST SRM® 1958 (*Organic Contaminants in Fortified Human Serum, Freeze-Dried*) para los ensayos de veracidad y precisión intermedia.

**Resultados.** Los porcentajes de recuperación obtenidos con la metodología estuvieron entre 88,4 y 97,5 %, y el sesgo fue menor del 20 %. Los límites de detección y cuantificación de los bifenilos policlorados indicadores policlorados fueron de 0,04 μg/L y 0,10 μg/L, respectivamente. La linealidad representada por el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) varió entre 0,9866 y 0,9886. La precisión expresada como desviación estándar relativa fue menor del 20 % en todo el rango lineal de trabajo (0,5-500 μg/L). Por último, se analizaron 115 muestras de población colombiana de diferentes zonas del país y se encontraron 65 muestras positivas, de las cuales dos estuvieron por encima de los valores de control biológico en humanos (*Human Biomonitoring Values*, HBM- II): 7,0 μg/L,  $2X\sum_{PCB 138, 153, 180}$ , y otras dos, por encima del HBM-I: 3,5 μg/L,  $2X\sum_{PCB 138, 153, 180}$ . **Conclusión.** El método desarrollado resultó ser preciso para el análisis de los bifenilos policlorados en

**Conclusión.** El método desarrollado resultó ser preciso para el análisis de los bifenilos policlorados en muestras de plasma sanguíneo y se puede utilizar para el control biológico de estos contaminantes en población colombiana.

Palabras clave: bifenilos policlorados; sangre; plasma; cromatografía de gases; espectrometría de masas; química analítica.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3529

### Validation of an analytical methodology to determine polychlorinated biphenyls in samples from blood plasma

**Introduction:** Polychlorinated biphenyls are among the five most toxic persistent contaminants for living organisms according to the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).

**Objective:** To standardize and validate an analytical method to determine and quantify polychlorinated biphenyl indicators in samples from blood plasma by means of gas chromatography-mass spectrometry. **Materials and methods:** We fortified a plasma pool to do the matrix assays. Additionally, we used the NIST SRM® 1958 reference material for the veracity and intermediate accuracy assays.

**Results:** Methodology recovery percentages ranged between 88.4 and 97.5%, and the bias was less than 20%. Detection and quantification limits were 0.04  $\mu$ g/L and 0.10  $\mu$ g/L, respectively, for all polychlorinated biphenyl indicators. The linearity represented by the determination coefficient (R²) varied between 0.9866 and 0.9886. Accuracy, expressed as relative standard deviation was less than 20% in all the linear work range (0.5-500  $\mu$ g/L). Finally, we analyzed 115 samples from Colombian population in various zones of the country and we found 65 positive samples, from which two samples were above HBM-II (7.0  $\mu$ g/L,  $2X\Sigma_{PCB 138, 153, 180}$ ), and two, above HBM-I (3.5  $\mu$ g/L,  $2X\Sigma_{PCB 138, 153, 180}$ ). **Conclusion:** The method we developed is accurate for PCB analysis in blood plasma samples and

**Conclusion:** The method we developed is accurate for PCB analysis in blood plasma samples and could be used for biological surveillance of these contaminants in the Colombian population.

**Key words:** Polychlorinated biphenyls; blood; plasma; chromatography, gas; mass spectrometry; chemistry, analytical.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3529

### Contribución de los autores:

Boris Santiago Ávila: responsable de la metodología, los resultados y su análisis Carolina Ramírez: participación en todas las etapas de la investigación Ambos autores participaron en la escritura del manuscrito.

Ávila BS, Ramírez C Biomédica 2017;37:561-70

Los bifenilos policlorados son una familia de 209 compuestos orgánicos que constan de dos anillos de benceno unidos por un enlace carbono-carbono. Los átomos de cloro se sustituyen en uno o en los restantes diez lugares disponibles. El número y la posición de los átomos de cloro determinan la clasificación, la geometría y, por ende, las propiedades de las distintas moléculas (figura 1) (1).

Según la Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), en el 2011, los bifenilos policlorados se catalogaron entre los cinco contaminantes orgánicos más tóxicos para los organismos vivos (2). Se han usado ampliamente en la industria por sus propiedades físicas, ya que son buenos aislantes y no son inflamables. Se encuentran en transformadores, refrigerantes y condensadores eléctricos, así como en muchos otros productos, como barnices, parafinas, resinas sintéticas, pinturas epóxicas y marinas, recubrimientos, lubricantes para corte, fluidos para intercambiador de calor y fluidos hidráulicos (1).

Se ha demostrado que las mezclas de bifenilos policlorados, similares (dioxin-like, DL) y no similares a la dioxina (non-dioxin-like, NDL), producen efectos endocrinos, inmunológicos y cancerígenos en animales adultos y, en dosis más bajas, también en el desarrollo cerebral del feto (3). En muchos estudios se ha sugerido que existe una relación entre la exposición a los bifenilos policlorados y el aumento del riesgo de padecer cáncer del aparato digestivo, del hígado y de la piel (4). Además, los niveles elevados de bifenilos policlorados en sangre se han relacionado con el cáncer del sistema linfático (4).

La exposición a los bifenilos policlorados puede afectar la reproducción humana, pues se ha asociado con menor fecundidad en las mujeres y disminución del número de espermatozoides móviles en los hombres (4). Durante el embarazo y la lactancia, la exposición se ha relacionado con retraso en el crecimiento y el desarrollo durante la infancia (4), así como con efectos neurológicos, como entumecimiento, dolores de cabeza, mayor frecuencia de infecciones y cambios en la piel, sobre todo sarpullidos y cloracné (4).

Correspondencia:

Carolina Ramírez, Grupo de Salud Ambiental y Laboral, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C, Colombia

Teléfono: 220 7700, extensión 1216

cramirezg@ins.gov.co

Recibido: 28/05/16; aceptado: 19/01/17

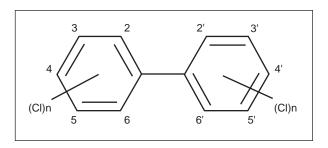


Figura 1. Estructura de la molécula de los bifenilos policlorados

La selección de los bifenilos policlorados indicadores (28, 52, 101, 138, 153 y 180) en el presente estudio, no respondió a un punto de vista toxicológico; sin embargo, se encuentran en mayor proporción los aroclores, con alrededor de 50 % de todos los congéneres bifenilos policlorados presentes en los alimentos de origen animal y en la grasa humana. Además, los bifenilos policlorados 138, 153 y 180 son los más persistentes en el ambiente (5).

La Human Biomonitoring Commission ha establecido dos valores críticos de concentración en suero (Human Biomonitoring Values, HBM) a partir de la suma de los bifenilos policlorados 138, 153 y 180 multiplicados por un factor de 2: HBM I=3,5 μg/L y HBM II=7,0 μg/L (6,7).

Los valores por debajo del HBM-I indican que no hay riesgo de efectos adversos sobre la salud y, en consecuencia, no es necesario intervenir (7). Los valores por encima del HBM-I y por debajo del HBM-II, indican que hay una fuente de exposición potencial que debe ser detectada para minimizar sus efectos (7). Un valor correspondiente al HBM-II indica que hay riesgo de efectos adversos sobre la salud, por lo cual debe reducirse la exposición y buscarse asesoría biomédica. En general, el valor HBM-I representa un nivel de control y, el HBM-II, un nivel de acción (7).

La Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnementet et du travail (Anses) estableció dos valores críticos en sangre a partir de la suma de la concentración de todos los bifenilos policlorados en el total de lípidos de la muestra: 700 ng/g de lípidos para mujeres lactantes y niños menores de tres años de edad, y 1.800 ng/g de lípidos para el resto de la población (8).

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar y validar un método analítico para la determinación y la cuantificación de los ibifenilos policlorados indicadores en muestras de plasma sanguíneo, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, con el fin de proporcionar una

herramienta de utilidad para el control biológico de la población colombiana, pues aunque a nivel mundial hay reportes sobre los niveles de bifenilos policlorados en sangre (9-17) y un amplio desarrollo de metodologías analíticas (18-23), en Colombia no existen estudios de control biológico de bifenilos policlorados que permitan a las entidades nacionales tomar decisiones para promover acciones de salud en este campo.

### Materiales y métodos

### Reactivos y disoluciones

Se utilizaron los estándares de los bifenilos policlorados indicadores 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180, y el estándar interno 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno de la marca Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Alemania), con una pureza del 99,0 %. También, se usó el estándar subrogado bifenilo policlorado 209 de la marca Ultra Scientific (North Kingstow, Estados Unidos), con una pureza de 98,8 %.

Se prepararon disoluciones madre (*stock*) en concentraciones cercanas a los 200 mg/L de todos los bifenilos policlorados indicadores y los estándares internos; posteriormente, se prepararon cuatro mezclas de trabajo de 2.000, 200, 20 y 2,0 µg/L. Todas las soluciones madre y las disoluciones de trabajo se prepararon en isooctano para análisis de la marca Merck, a excepción del bifenilo policlorado 209, que se preparó en n-hexano. Se almacenaron a -20 ± 2 °C, y la estabilidad de las disoluciones se verificó para un periodo de cuatro meses. Las disoluciones de calibración se prepararon por dilución apropiada de la mezcla de trabajo en el extracto de la matriz.

Con fines de validación, se fortificó un *pool* de plasma humano para hacer los ensayos en la matriz, el cual se obtuvo a partir de tres unidades de plasma sanguíneo suministradas por el Grupo de la Red Nacional de Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión del Instituto Nacional de Salud de Colombia. Se empleó, además, el material de referencia NIST SRM1958 (*Organic Contaminants in Fortified Human Serum, Freeze-Dried*) para los ensayos de veracidad y presión intermedia.

### Instrumentos y equipos

El análisis cromatográfico se hizo en un cromatógrafo de gases HP 6890N® con inyector automático 7683, equipado con un inyector de división conectado a una columna capilar HP-5MS® (30 m, 0,32 mm d.i., 0,25 µm) acoplada a un detector selectivo de masas de cuádruplo simple 5975B® (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). Las

condiciones de operación del equipo fueron las siguientes: volumen de inyección, 2 µl; temperatura del inyector, 280 °C; modalidad de inyección sin división y pulsada a 60 psi durante 0,5 minutos.

El programa de temperatura del horno tuvo la siguiente rampa: temperatura inicial de 100 °C durante un minuto y una rampa de 14 °C por minuto hasta 130 °C, y luego una de 8 °C por minuto hasta 300 °C, la cual se mantuvo por un minuto. La temperatura de la línea de transferencia al espectrómetro de masas se mantuvo en 280 °C. El tiempo de análisis fue de 25,4 minutos con un flujo constante de 1,0 ml por minuto de helio de grado 5,0.

El espectrómetro de masas se operó en el modo de ionización por impacto de electrones a 70 eV y la modalidad de adquisición fue la de monitorización selectiva de iones ( $Selected\ lon\ Monitoring,\ SIM$ ). En el cuadro 1 se presentan los iones de cuantificación ( $target\ ions$ ) y de confirmación ( $Q_1,\ Q_2$ ) utilizados para los bifenilos policlorados indicadores y para los estándares internos.

### Análisis de las muestras

El análisis de las muestras se hizo en tres etapas: extracción, limpieza y análisis cromatográfico.

Extracción. Se adicionó 1 ml de plasma en un tubo de ensayo de vidrio de 15 ml; se agregaron 20 µl de estándar subrogado (PCB 209) a 200 µg/L y 1 ml de etanol. Esta mezcla se agitó en el mezclador de vórtice durante 10 segundos y, posteriormente, se adicionaron 2 ml de n-hexano y se agitó de nuevo en el mezclador de vórtice durante 1,5 minutos para transferir los bifenilos policlorados indicadores de la matriz a la fase orgánica de n-hexano. Después, se dejó reposar la muestra durante 2 minutos, y la fase orgánica en la parte superior se transfirió con

**Cuadro 1.** Tiempo de retención (TR), iones de cuantificación y confirmación de los bifenilos policlorados indicadores y los estándares internos

Compuesto	TR (minutos)	Target	Q <sub>1</sub>	Q <sub>2</sub>
PCB 28	13.181	186	258	256
PCB 52	14.025	290	292	294
PCB 101	16.104	326	324	328
PCB 118	17.568	326	324	328
PCB 138	18.702	360	362	290
PCB 153	18.070	360	362	290
PCB 180	20.210	396	394	324
2,4,5,6-tetracloro- m-xileno (E.I.)	9.863	209	244	242
PCB 209 (E.S.)	23.655	498	500	496

Ávila BS, Ramírez C Biomédica 2017;37:561-70

una pipeta Pasteur de vidrio a un tubo de ensayo de vidrio diferente. La extracción se repitió dos veces y se obtuvo un volumen final aproximado de 6 ml de fase orgánica.

El extracto orgánico se llevó hasta el estado de sequedad en el equipo Rapidvap® a una temperatura de 35 °C, una velocidad de agitación de 25 % y 100 mbar de vacío durante 35 minutos; la presión se disminuyó lentamente en 100 unidades de presión por minuto desde 600 hasta 100 mbar.

Limpieza. En esta fase, primero se acondicionó el cartucho de florisil con 25 ml de n-hexano a presión atmosférica. Después, se reconstituyó el extracto orgánico con 6 ml de n-hexano, se vertió en el cartucho de florisil y se lavó el tubo de ensayo tres veces con 2 ml de n-hexano, con lo cual se obtuvo un volumen de carga aproximado de 12 ml. Después, se eluyó el extracto orgánico con 15 ml de n-hexano y se recogió la fracción orgánica limpia (sin lípidos) en un tubo de vidrio de 25 ml. Posteriormente, el extracto orgánico se evaporó en el equipo Rapidvap<sup>®</sup> a una temperatura de 35 °C, una velocidad de agitación de 20 % y 50 mbar de vacío durante 125 minutos; la presión se disminuyó lentamente en 100 unidades de presión por minuto desde los 600 hasta los 50 mbar.

Análisis cromatográfico. En esta última fase, se reconstituyó el extracto con 20 μl de estándar interno a 200 μg/L y 180 μl de isooctano, se lo transfirió a un inserto de 300 μl en un vial de cromatografía de 2 ml y se inyectó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

### Validación

Selectividad y especificidad. Estas se determinaron con 10 extracciones del *pool* de plasma, y se verificaron las interferencias de la matriz de los iones seleccionados en el tiempo de retención de cada bifenilo policlorado indicador.

Límites de detección y cuantificación. Los límites de detección y de cuantificación se determinaron con el método propuesto por la *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) (24) con diez extracciones del *pool* de plasma, y se confirmaron con seis extracciones del *pool* de plasma fortificado a 0,04 y 0,1 µg/L.

Linealidad y rango de trabajo, efecto matriz. Se hicieron 12 curvas de calibración en el disolvente (isooctano) y el extracto de la matriz (plasma), en un rango de 0,5 a 500 µg/L (nueve niveles de calibración).

Veracidad y exactitud. La veracidad se calculó como porcentaje de recuperación (% R) extrayendo 12 fortificaciones de cada nivel de calibración (n=108) y, el sesgo (% E), con la extracción del material de referencia NIST SRM 1958 (n=18).

Precisión. Esta se determinó con los resultados obtenidos en los ensayos de veracidad y se expresó como desviación estándar relativa de la repetibilidad y la precisión intermedia de los resultados entre analistas.

Estabilidad. La estabilidad de los bifenilos policlorados indicadores se evaluó en tres ciclos de congelación y descongelación a 7,0 μg/L y en plasma fortificado que se extrajo a los 0, 1, 3, 7, 15, 30, 60 y 120 días. También, se evaluó la estabilidad de las mezclas de trabajo en un periodo de seis horas en el automuestreador y durante cuatro meses en almacenamiento a -20±3 °C.

Incertidumbre. La estimación de la incertidumbre de medida se hizo según la Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM), propuesta por EURACHEM (25).

## Análisis de muestras de sangre de la población colombiana

Se analizaron 115 muestras de plasma de la población colombiana de diferentes zonas del país, con el método analítico desarrollado y validado en el Grupo de Salud Ambiental y Laboral del Instituto Nacional de Salud.

### Resultados

### Selectividad y especificidad

Se examinaron los 10 cromatogramas obtenidos en corriente total de iones (total ion current, TIC) y monitorización selectiva de iones (Selected Ion Monitoring, SIM). En la figura 2 se presenta un cromatograma TIC de una inyección del extracto de la matriz del pool de plasma mencionado anteriormente (en negro) y un nivel de calibración en el extracto de la matriz de los bifenilos policlorados indicadores con sus respectivos estándares internos de calibración y subrogados (en azul), lo cual se hizo con el fin de detectar interferencias de la matriz en los tiempos de retención de los bifenilos policlorados indicadores (26), ya que en el modo de monitorización selectiva de iones se analizaron las interferencias por cada ion y en TIC, se analizaron el conjunto de interferencias y su efecto en la identificación y cuantificación de los bifenilos policlorados indicadores, teniendo en

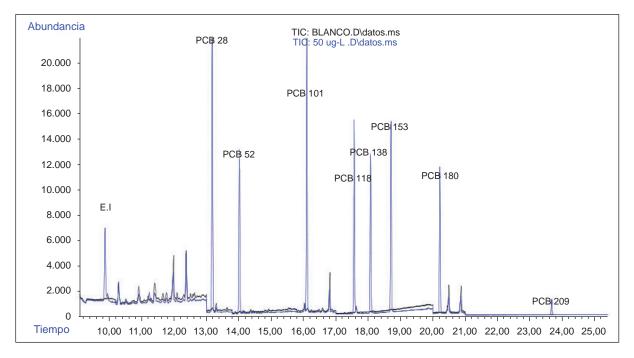


Figura 2. Cromatograma de corriente total de iones de un extracto de la matriz del *pool* de plasma (en negro) y un nivel de 50 μg/L en disolvente de los indicadores de bifenilos policlorados y los estándares internos (en azul)

cuenta una razón iónica inferior a 30 % (26) para la confirmación del indicador en el extracto de la matriz fortificado.

Límites de detección y de cuantificación. Los límites de detección y de cuantificación de los bifenilos policlorados indicadores, estimados y confirmados mediante el método de la US EPA, fueron de 0,04 y 0,10 µg/l, respectivamente. En la figura 3 se presenta un cromatograma de monitorización selectiva de iones del bifenilo policlorado 153 obtenido en la extracción de 0,04 µg/L de plasma sanguíneo fortificado.

Linealidad y rango de trabajo, efecto matriz. Los coeficientes de determinación (R²) estuvieron entre 0,9866 y 0,9886 en el extracto de la matriz. Para probar la hipótesis, se usaron pruebas como la del intercepto, la de la pendiente, la de correlación y el análisis de varianza (ANOVA). Con dichas pruebas se demostró la linealidad en el rango de 0,5 a 500 µg/L de los bifenilos policlorados indicadores en plasma sanguíneo. En el cuadro 2 se resumen los resultados obtenidos.

Veracidad y exactitud. En el cuadro 3 se presentan los promedios de los porcentajes de recuperación calculados en cada nivel de ensayo y la prueba de Cochran para la homogeneidad de la varianza (G) experimental calculada (G teórica: 0,2568; K=9; n=12).

En el cuadro 4 se presenta el porcentaje de sesgo (% E) obtenido para cada bifenilos policlorados indicadores según las extracciones realizadas por dos analistas del material de referencia NIST SRM 1958 (n=18).

Precisión. Los valores de desviación estándar relativa de la repetibilidad del método estuvieron por debajo de 20 %. La variación de la extracción del material de referencia NIST SRM1958 entre los analistas, fue inferior a 20 %. Con los resultados obtenidos, se demostró que el método desarrollado es preciso (26).

Incertidumbre. La estimación de la incertidumbre (u) de medida se hizo según la guía (GUM) propuesta por EURACHEM. En el cuadro 5 se presentan los valores de incertidumbre expandida y los porcentajes calculados para cada indicador de bifenilos policlorados, con un valor de cobertura k=2 y un nivel de confianza de 95 %.

# Resultados de los análisis de las muestras de plasma

Se analizaron 115 muestras de plasma de población colombiana de diferentes zonas del país y se encontraron 65 muestras positivas (concentración por encima de 0,04 µg/L) para uno o varios bifenilos policlorados indicadores. En dos de las 65 muestras positivas se encontraron valores por



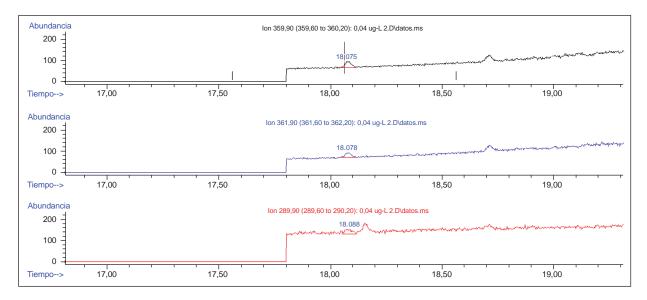


Figura 3. Cromatograma de monitorización selectiva de iones del bifenilo policlorado 153 de un extracto de la matriz fortificado a un nivel de 0,04 µg/L

Cuadro 2. Linealidad de los indicadores de bifenilos policlorados en el extracto de la matriz

РСВ	R <sup>2</sup>	Pendiente	Intercepto	F <sub>Experimental</sub>	F <sub>Crítico</sub>
PCB 28	0,9866	0,1331	0,4256	7724,2	3,85E <sup>-100</sup>
PCB 52	0,9886	0,0700	0,1825	9140,9	6,21E <sup>-104</sup>
PCB 101	0,9874	0,1127	0,3193	8233,2	1,41E <sup>-101</sup>
PCB 118	0,9883	0,0966	0,2635	8887,7	2,67E <sup>-103</sup>
PCB 138	0,9886	0,0763	0,2227	9144,6	6,08E <sup>-104</sup>
PCB 153	0,9884	0,0838	0,2338	8931,7	2,06E <sup>-103</sup>
PCB 180	0,9868	0,0617	0,1149	7838,7	1,80E <sup>-100</sup>

Cuadro 3. Veracidad y porcentaje de recuperación

Concentración	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180
0,5 μg/L	76,6	73,2	93,8	95,8	84,1	103,5	84,3
1,0 µg/L	81,4	82,6	94,0	91,9	89,2	85,8	85,1
2,0 µg/L	88,7	86,6	97,4	100,3	94,4	94,2	97,6
3,5 µg/L	85,0	86,6	95,8	95,5	93,6	94,3	98,2
7,0 µg/L	91,3	94,5	98,9	101,3	99,1	97,7	102,0
25 μg/L	99,3	106,6	109,6	111,2	109,9	109,0	110,3
50 μg/L	90,7	91,7	95,5	95,0	95,1	94,4	96,5
100 μg/L	89,3	90,2	92,3	91,3	91,2	90,3	91,5
500 μg/L	92,9	94,9	96,4	95,5	95,0	94,3	99,5
Promedio	88,4	89,7	97,1	97,5	94,6	96,0	96,1
G Exp	0,232	0,2413	0,2396	0,245	0,239	0,2532	0,2249

G Exp: G experimental calculada

Cuadro 4. Veracidad y sesgo (NIST SRM 1958)

	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180
Valor del material de referencia ng/kg Promedio de analistas 1 y 2 ng/kg	402,0 354,2	401,0 440,2	409,0 334.1	412,0 440.2	473,0 497.1	457,0 443.8	459,0 495.8
% E	11,9	9,8	18,3	6,8	5,1	2,9	8,0

<sup>%</sup> E: porcentaje de sesgo

**Cuadro 5.** Estimación de la incertidumbre de medida según la quía (GUM) propuesta por EURACHEM

РСВ	U (µg/L)	U expandida (μg/L)	% U
PCB 28	0,004	0,008	1,6
PCB 52	0,003	0,006	1,2
PCB 101	0,003	0,007	1,4
PCB 118	0,003	0,007	1,4
PCB 138	0,004	0,007	1,4
PCB 153	0,004	0,008	1,6
PCB 180	0,003	0,006	1,2

U: incertidumbre

encima del HBM- II (7,0 µg/l,  $2X\sum_{PCB~138,~153,~180}$ ) y, en otras dos, por encima del HBM-I (3,5 µg/l,  $2X\sum_{PCB~138,~153,~180}$ ); todas las demás muestras estuvieron por debajo del valor HBM-I.

### Discusión

En la figura 2 se observa que no hubo interferencias en los tiempos de retención de interés confirmados con la evaluación de los cromatogramas de monitorización selectiva de iones, los cuales no presentaron interferencias en dichos iones, ya que en su selección se tuvo en cuenta una intensidad alta de fragmentación (m/z>200). Estos criterios se cumplieron en todos los casos, con excepción del bifenilo policlorado 28, en el cual se escogió un ion de cuantificación de 186 m/z, ya que era el de mayor intensidad y no tenía interferencias. Con estos resultados, se demostró que el método desarrollado fue selectivo y específico para los bifenilos policlorados indicadores que se habían seleccionado.

Con los límites de detección determinados se constató que es posible diferenciar las señales de los iones de cuantificación y de confirmación de los bifenilos policlorados indicadores, en este caso, el bifenilo policlorado indicador 153, del ruido instrumental y de la matriz a 0,04 µg/L. Como se aprecia en la figura 3, en el ion m/z 290, se eluyó una interferencia cercana al tiempo de retención del bifenilo policlorado indicador 153; sin embargo, en los demás iones no se observaron otros picos, por lo cual se tuvo plena certeza de que dicho pico era una interferencia de la matriz en este ion; además, la razón iónica del m/z 290 en el tiempo de retención del bifenilo policlorado 153 fue inferior a 30 % (26).

El límite de cuantificación se determinó como tres veces la concentración del de detección (es decir, 0,10 μg/L) al evaluar la dispersión de las seis extracciones con un criterio de aceptación de la desviación estándar relativa de ≤20 %. La

desviación estándar relativa más alta se encontró en el bifenilo policlorado indicador 180, con 7,54 %, por lo cual los límites de detección y de cuantificación de los bifenilos policlorados indicadores finalmente se determinaron en 0,04 µg/L y 0,10 µg/L, respectivamente.

Por otro lado, los valores del valor estadístico F, calculados experimentalmente en el ANOVA, fueron más altos que los F críticos, lo que indicó que existía una relación directamente proporcional entre la respuesta del equipo y la concentración de cada bifenilo policlorado, con un nivel de confianza de 95 %.

El efecto matriz se determinó comparando las pendientes de la curva de cada indicador de bifenilos policlorados en el extracto de la matriz y el disolvente. En el cuadro 6 se presentan las pendientes obtenidas y el intervalo; como se observa, no hubo efecto matriz para el bifenilo policlorado indicador 52, ya que los intervalos de las pendientes en el disolvente y la matriz se superpusieron, a diferencia del resto de los bifenilos policlorados indicadores, en los cuales sí hubo efecto matriz.

Con los resultados del porcentaje de recuperación, se observó que todos los bifenilos policlorados indicadores se encontraban en el rango de 70 a 120 %, lo que indica que bajo el parámetro de exactitud el método tuvo un buen comportamiento (26). También, se pudo reportar un porcentaje de recuperación (% R) del método (promedio) para cada indicador de bifenilos policlorados, ya que la G experimental calculada (prueba de Cochran para la homogeneidad de la varianza) fue menor que la teórica, lo que indica que hubo homogeneidad de varianzas y que la recuperación no se vio afectada por la concentración.

En este orden de ideas, el sesgo para todos los bifenilos policlorados indicadores del estudio fue menor del 20 %, lo que indica que el método fue veraz para el propósito planteado (cuadro 4) (26). Con los resultados de recuperación y sesgo, es posible afirmar que el método desarrollado cumplió con los parámetros de veracidad para todos los bifenilos policlorados indicadores.

Por otro lado, mediante gráficas de control a lo largo de 120 días en condiciones de congelación y con ciclos de congelación y descongelación, se demostró que todos los bifenilos policlorados indicadores eran estables, al igual que las mezclas de trabajo, las cuales también fueron estables a corto, mediano y largo plazo.

Ávila BS, Ramírez C Biomédica 2017;37:561-70

Por último, los valores de incertidumbre indican que el método desarrollado demostró un alto grado de confianza de los resultados de concentración de los bifenilos policlorados indicadores en muestras de plasma, además de ser un método útil para investigaciones de control biológico de estos contaminantes orgánicos persistentes en población colombiana.

En el cuadro 7 se presentan los resultados de la validación hecha en otros trabajos de investigación mediante instrumentos, métodos de procesamiento y análisis diferentes, los cuales son comparables con los de este estudio. También, puede concluirse que el método de análisis desarrollado permitió evaluar los niveles de bifenilos policlorados en plasma sanguíneo teniendo en cuenta los valores HBM-I y HBM-II, y según los criterios adecuados de validación internacional consignados en los trabajos consultados.

**Cuadro 6.** Pendiente de la curva en el disolvente y el extracto de la matriz de los indicadores de bifenilos policlorados (PCB)

PCB	Pendiente de la curva en el disolvente	Pendiente de la curva en la matriz		
PCB 28	0,1133 ± 0,0014	0,1331 ± 0,0030		
PCB 52	$0.0689 \pm 0.0004$ *	$0.0700 \pm 0.0015$ *		
PCB 101	$0.0464 \pm 0.0006$	$0,1127 \pm 0,0025$		
PCB 118	$0,0689 \pm 0,0005$	$0,0966 \pm 0,0020$		
PCB 138	$0.0592 \pm 0.0004$	$0,0763 \pm 0,0016$		
PCB 153	$0.0644 \pm 0.0005$	$0.0838 \pm 0.0018$		
PCB 180	$0,0418 \pm 0,0005$	$0.0617 \pm 0.0014$		

<sup>\*:</sup> PCB 52 no tiene efecto matriz

En el cuadro 8 se presentan los resultados de diversos estudios de evaluación de los bifenilos policlorados indicadores en plasma sanguíneo en otros países del mundo que, comparados con los obtenidos en el presente estudio, se encuentran en el mismo rango. Los valores encontrados fueron, en su mayoría, inferiores al HBM-I y al HBM-II, lo cual indica que los niveles de los bifenilos policlorados indicadores en la población evaluada son bajos.

Se validó, así, una metodología analítica para la determinación de los bifenilos policlorados indicadores en plasma mediante cromatografía de gases con detección selectiva de masas, la cual es específica para los analitos de interés. El método demostró linealidad, precisión y exactitud bajo las condiciones analíticas del proceso y según lo establecido en la bibliografía consultada para la determinación de contaminantes orgánicos persistentes en muestras de sangre (suero o plasma) (26,27).

### **Agradecimientos**

Al Grupo de Red Nacional de Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión del Instituto Nacional de Salud, por suministrar las unidades de plasma sanguíneo para realizar el estudio.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que durante la realización de esta investigación no tuvieron ningún conflicto de intereses.

Cuadro 7. Resultados de la validación en diferentes estudios

РСВ	Precisión (RSD)	Veracidad (% R)	LD (µg/L)	LC (µg/L)	U %	Referencia
180	12,3	114,7	0,05	0,05	< 25	(28)
180	9,0	86-105	0,03	0,05	nr	(29)
138, 153 y 180	nr	70-98	1,00	nr	nr	(30)
180	nr	86,7	nr	0,05	nr	(31)
180	< 2 %	60	nr	0,08	nr	(32)
180	13,5	96,1	0,04	0,10	1,2	Este estudio

RSD: desviación estándar relativa; LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación; nr: no reporta información; U: incertidumbre

Cuadro 8. Resultados de los niveles de los bifenilos policlorados en plasma sanguíneo de diferentes estudios

РСВ	Este estudio Rango (µg-L)	Este estudio promedio (µg-L)	Estados Unidos (μg-L)	España (µg-L)	Rumania (µg-L)	Bélgica (µg-L)	Italia (μg-L)
118	nd - 4,35	0,53	0,22 - 0,62	nr	0,02 - 1,12	0,14 - 0,49	nd - 1,58
138	nd - 6,22	0,59	0,76 - 2,59	nd - 0,4	0,11 - 1,10	0,60 - 1,46	nd - 5,39
153	nd - 5,95	0,61	0,94 - 4,14	> 0,15 - 0,60	0,26 - 2,12	1,13 - 3,16	nd - 9,26
180	nd - 3,69	0,39	0,78 - 3,33	> 0,08 - 0,60	0,28 - 2,01	0,92 - 2,75	nd - 13,81

nd: no detectable; nr: no reporta información Nota: los datos se tomaron de la referencia 29

### **Financiación**

Esta investigación fue financiada por el Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible en el marco del convenio especial de cooperación Nº FP44842-387-2014 entre el Instituto Nacional de Salud, la Asociación Colombiana para el Avance de la Ciencia y Colciencias.

### Referencias

- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Transformadores y condensadores con PCB: desde la gestión hasta la reclasificación y eliminación. Primera edición. Ginebra: PNUMA; 2002. Fecha de consulta: 4 de marzo de 2014. Disponible en: http://www. inti.gob.ar/pcb/documentos/informesReportesDocumentos/ Interes/PCBtranscap\_s.pdf
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
   ToxFAQs™ Polychlorinated biphenyls (PCB). Fecha de consulta: 5 de mayo de 2016. Disponible en: http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\_tfacts17.html
- McGovern V. PCBs are endocrine disruptors: Mixture affects reproductive development in female mice. Environ Health Perspect. 2006;114:A368-9.
- Facts on Health and Environment, Green Facts. PCB bifenilos policlorados. Fecha de consulta: 5 de mayo de 2016. Disponible en: http://www.greenfacts.org/es/pcb/l-2/6-effects-human.htm#1
- European Food Safety Authority. Results of the monitoring of non-dioxin-like PCBs in food and feed. EFSA Journal. 2010;8:1701. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1701.
- Schettgen T, Alt A, Esser A, Kraus T. Current data on the background burden to the persistent organochlorine pollutants HCB, p, p-DDE as well as PCB 138, PCB 153 and PCB 180 in plasma of the general population in Germany. Int J Hyg Environ Health. 2015;218:380-5. https://doi. org/10.1016/j.ijheh.2015.02.006
- Human Biomonitoring Commission (HBM Commission).
   Human biomonitoring (HBM) is an important tool in environmental medicine to assess and evaluate the level of internal exposure of the general population, population groups and individuals to environmental toxins. Fecha de consulta: 12 de junio de 2015. Disponible en: http://www.umweltbundesamt. de/en/topics/health/commissions-working-groups/human-biomonitoring-commission-hbm-commission
- Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail - Anses. Opinion of the French Food Safety Agency on interpreting the health impact of PCB concentration levels in the French population. AFSSA - Request N° 2008-SA-0053. 2010. Fecha de consulta: 12 de junio de 2015. Disponible en: https://www.anses.fr/fr/system/ files/RCCP2008sa0053EN.pdf
- Ayotte P, Dewailly E, Ryan J, Bruneau S, Lebel G. PCBs and dioxin-like compounds in plasma of adult Inuit living in Nunavik (Arctic Quebec). Chemosphere. 1997;34:1459-68.
- Covaci A, Koppen G, Cleuvenbergen RV, Schepens P, Winneke G, van Larebeke N, et al. Persistent organochlorine pollutants in human serum of 50-65 years old women in the flanders environmental and health study (FLEHS).

- Part 2: Correlations among PCBs, PCDD/PCDFs and the use of predictive markers. Chemosphere. 2002;48:827-32. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00112-1
- Anthony P. Polychlorinated biphenyl (PCB) exposure assessment by multivariate statistical analysis of serum congener profiles in an adult Native American population. Environ Res. 2005;98:284-302. https://doi.org/10.1016/j. envres.2004.09.004
- Albrecht M, Appel M, Hilger B, Völkel W, Liebl B, Roscher E. PCBs, PCDD/Fs and PBDEs in blood samples of a rural population in South Germany. Int J Hyg Environ Health. 2015;218:41-6. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2014.07.004
- Gabrio T, Piechotowski I, Wallenhorst T, Klett M, Cott L, Friebel P, et al. PCB-blood levels in teachers, working in PCB-contaminated schools. Chemosphere. 2000;40:1055-62. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00353-7
- Koppen G, Covaci A, van Cleuvenbergen R, Schepens P, Winneke G, Nelen V, et al. Persistent organochlorine pollutants in human serum of 50 65 years old women in the Flanders Environmental and Health Study (FLEHS). Part 1: Concentrations and regional differences. Chemosphere. 2002;48:811-25. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02) 00111-X
- Schettgen T, Gube M, Esser A, Alt A, Kraus T. Plasma polychlorinated biphenyls (PCB) levels of workers in a transformer recycling company, their family members, and employees of surrounding companies. J Toxicol Environ Health A. 2012;75:414-22. https://doi.org/10.1080/1528739 4.2012.674905
- Tanabe S, Senthilkumar K, Kannan K, Subramanian N. Monitoring of PCBs in human blood plasma: Methodological developments and influence of age, lactation, and fish consumption. Arch Environ Contam Toxicol. 1997;32:329-36.
- 17. Wittsiepe J, Fobil J, Till H, Burchard G, Wilhelm M, Feldt T. Levels of polychlorinated dibenzo-P-dioxins, dibenzofurans (PCDD/Fs) and biphenyls (PCBs) in blood of informal e-waste recycling workers from Agbogbloshie, Ghana, and controls. Environ Int. 2015;79:65-73. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.03.008
- Atuma S, Aune M. Method for the determination of PCB congeners and chlorinated pesticides in human blood serum. Bull Environ ContamToxicol. 1999;62:8-15.
- Udai S, Harold M, Wheatley S, Wheatley B. Congener specific analysis of polychlorinated biphenyls (PCBs) in serum using GC/MSD. Chemosphere. 1995;30:1969-77. https://doi.org/10.1016/0045-6535(95)00078-M
- López R, Goñi F, Etxandia A, Millán E. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007;846:298-305. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.009
- Moreno F, Torres M, Garrido A, Martínez J, Olea-Serrano F, Olea N. Determination of organochlorine compounds in human biological samples by GC-MS/MS. Biomed Chromatogr. 2004;18:102-11. https://doi.org/10.1002/bmc.300
- 22. Turci R, Franco B, Minoia C. Determination of coplanar and non-coplanar polychlorinated biphenyls in human serum by gas chromatography with mass spectrometric detection:

Ávila BS, Ramírez C Biomédica 2017;37:561-70

Electron impact or electron-capture negative ionization? Rapid Commun Mass Spectrom. 2003;17:1881-8. https://doi.org/10.1002/rcm.1129

- Vizcaíno E, Arellano L, Fernández P. Analysis of whole congener mixtures of polybromodiphenyl ethers by gas chromatography-mass spectrometry in both environmental and biological samples at femtogram levels. J Chromatogr A. 2009;1216:5045-51. https://doi.org/10.1016/j.chroma. 2009.04.049
- Corley J. Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residue in foods. Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.; 2003.
- EURACHEM/CITAC Guide CG 4. Cuantificación de la incertidumbre en medidas analíticas. Fecha de consulta: 4 de febrero de 2016. Disponible en: http://www.citac.cc/ QUAM2012\_P1\_ES.pdf
- European Commission. Safety of the food chain pesticides and biocides, SANTE/11945/2015. Fecha de consulta: 4 de febrero de 2016. Disponible en: http://ec.europa. eu/food/plant/docs/plant\_pesticides\_mrl\_guidelines\_ wrkdoc\_11945\_en.pdf
- López R, Goñi F, Etxandia A, Milan E. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007;846:298-305. https://doi.org/ 10.1016/j.jchromb.2006.09.009

- 28. Turci R, Balducci C, Brambilla G, Colosio C, Imbriani M, Mantovani A, et al. A Simple and fast method for the determination of selected organohalogenated compounds in serum samples from the general population. Toxicol Lett. 2010; 192: 66-71. http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet. 2009.04.011
- Lopez R, Goñi F, Etxandia A, Milan E. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. J Chromatogr B. 2007;846:298-305. http://dx.doi.org/ 10.1016/j.jchromb.2006.09.009
- Arrebola J.P, Cuellar M, Quevedo M, Claure E, Antelo S.R, Mutch E, et al. Concentration of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum and adipose tissue from Bolivia. Environ Res. 2012;112: 40-7. http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2011.10.006
- 31. **Gill U, Schwartz H, Wheatley B.** Congener Specific Analysis of Polychlorinated biphenyls (PCBs) in serum using GC/MSD. Chemosphere. 1995;30:1969-77. http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535(95)00078-M
- Lopez R, Goñi F, Etxandia A, Milan E, Amiano P. High throughput method for the determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum. J Chromatogry B. 2007; 852:15-21. http://dx.doi.org/10.1016/j. jchromb.2006.12.049.

### NOTA TÉCNICA

# El caseinato de sodio incrementa número de linfocitos B en ratones.

Vanihamín Domínguez-Meléndez<sup>1</sup>, Itzen Aguiñiga-Sánchez<sup>2</sup>, Leticia Moreno-Fierros<sup>3</sup>, Beatriz Torres<sup>1</sup>, Edelmiro Santiago Osorio<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Centro de Estudios y Servicios en Salud, Universidad Veracruzana, Veracruz, México
- <sup>2</sup> Unidad Multidisciplinaria de Investigación, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México
- Unidad de Investigación en Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, México

**Introducción.** El caseinato de sodio, una sal de la caseína utilizada como agente proinflamatorio en ratones, es capaz de inducir granulopoyesis en vivo e incrementar la producción de citocinas esenciales en dicho evento.

**Objetivo.** Evaluar si el caseinato de sodio es capaz de inducir un efecto biológico en células de origen linfoide y la producción de citocinas involucradas con este linaje.

**Materiales y métodos:** Se utilizaron ratones hembra BALB/c de 8 a 12 semanas de edad. Los animales se inyectaron cuatro veces, con intervalos de 48 horas, por vía intraperitoneal con 1 ml de caseinato de sodio (10 % de SFB p/v). La población de linfocitos B y la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) se analizaron mediante citometría de flujo. La detección de la interleucina 7 se evaluó mediante la técnica de ELISA.

**Resultados.** Tras la inyección por vía intraperitoneal, el número de linfocitos B 220+ provenientes del bazo de ratones tratados con caseinato de sodio aumentó comparados con los que solo recibieron el vehículo como tratamiento (89,01±1,03 Vs. 75,66±2,08), así como la incorporación de BrdU en células B220+ (38,59±4,48 Vs. 11,82±1,04). Se evidenció, asimismo, el incremento en la concentración de la interleucina 7 (IL-7) en el suero de los ratones tratados con caseinato de sodio, comparados con los que solo recibieron el vehículo (62,1±17,5 Vs. 26,9±4,4 pg/ml).

**Conclusión.** El caseinato de sodio fue capaz de aumentar el número de linfocitos B en bazo de ratones, así como inducir la producción de IL-7, citocina clave para la linfopoyesis B.

Palabras clave: linfocitos B; proliferación de la célula; inflamación; citosina; citometría de flujo; ensayo de inmunoadsorción enzimática.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3604

### Sodium caseinate increases the number of B lymphocytes in mouse.

**Introduction:** Sodium caseinate, a casein salt, is a proinflammatory agent in mice, and it is able to induce granulopoiesis *in vivo* and to increase the production of cytokines, which is key for this biological process. **Objective:** To assess whether sodium caseinate is able to induce a biological effect on cells from lymphoid origin and the production of cytokines involved in this lineage *in vivo*.

**Materials and methods:** We used female BALB /c mice from 8 to 12 weeks old. The animals were injected intraperitoneally (IP) with 1 ml of sodium caseinate (10% PBS w/v) four times every 48 hours. The B cell populations and the incorporation of BrdU were analyzed by flow cytometry. Detection of interleukin-7 was assessed by ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

**Results:** We established that after intraperitoneal injection, the number of B lymphocytes 220+ from the spleen of mice treated with sodium caseinate increased compared to those that only received the vehicle  $(89.01\pm1.03 \text{ vs } 75.66\pm2.08)$ , and the same was observed with the incorporation of BrdU in B220 + cells  $(38.59\pm4.48 \text{ vs } 11.82\pm1.04 \text{ respectively})$ . We also established that the concentration of interleukin-7 (IL-7) in the serum of mice treated with sodium caseinate increased compared to those that only received the vehicle  $(62.1\pm17.5 \text{ vs } 26.9\pm4.4 \text{ pg/ml})$ .

### Contribución de los autores:

Vanihamín Domínguez: trabajo experimental en citometría de flujo, obtención de muestras biológicas para el análisis mediante la técnica de ELISA, análisis de datos y escritura del manuscrito

Itzen Aguiñiga: técnicas de ELISA para detección de la citocina IL-7 y manejo de datos

Leticia Moreno: asesoría en la estandarización de la técnica utilizada en la citometría de flujo y análisis de los resultados

Beatriz Torres y Edelmiro Santiago: análisis de resultados y redacción del manuscrito

Todos los autores participaron en la revisión final del manuscrito.

**Conclusion:** Sodium caseinate was able to increase the number of B lymphocytes in the spleen; it also induced IL-7 production, a cytokine that is key for the B cell lymphopoiesis.

**Key words:** B-lymphocytes; cell proliferation; inflammation; cytosine; flow cytometry; enzyme-linked immunosorbent assay.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3604

El caseinato de sodio, una sal de la caseína y principal proteína de la leche, se ha utilizado como agente proinflamatorio desde hace más de 20 años; se ha demostrado que es capaz de inducir migración de granulocitos, macrófagos y linfocitos en el sitio de inyección cuando es administrado por vía intraperitoneal en ratones (1,2).

En un estudio se reportó que el caseinato de sodio indujo la producción del factor estimulante de colonias de macrófagos (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*, M-CSF) in vitro (3). Se ha demostrado, también, que la administración por vía intraperitoneal de caseinato de sodio en un modelo de ratón leucémico, incrementa su porcentaje de supervivencia (4), y que, tras la inyección del caseinato, este es capaz de movilizar células madre hematopoyéticas a la sangre periférica en el ratón (5).

Nuestro grupo de trabajo demostró que, mediante la inyección de caseinato de sodio, se induce la granulopoyesis en médula ósea, y se incrementan los niveles séricos del factor estimulante de colonias de granulocitos (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*, G-CSF) y del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF) (6). El caseinato de sodio es un agente proinflamatorio capaz de actuar sobre células de origen hematopoyético y, también, incrementa las concentraciones de citocinas con un rol fundamental en la mielopoyesis (7).

Por otra parte, la administración de péptidos de b-caseína a cultivos de linfocitos de carnero incrementa la proliferación de linfocitos B (8) e induce la proliferación de las células B provenientes del bazo *in vitro* (9), sugiere que el caseinato de sodio podría modular la proliferación de este linaje celular.

### Correspondencia:

Edelmiro Santiago Osorio, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Batalla 5 de mayo s/n, esquina fuerte de Loreto, Col. Ejército de Oriente, Iztapalapa, C.P. 09230, Ciudad de México, México

Teléfono: (0155) 5623 0791 edelmiros@yahoo.com

Recibido: 04/10/16; aceptado: 22/02/17

En este estudio, se analizó el posible efecto del caseinato de sodio sobre los linfocitos B en la médula ósea y en el bazo. Con este propósito, se evaluó si su inyección por vía intraperitoneal incrementaba el número de linfocitos en estos órganos, así como la concentración sérica de la IL-7, citocina clave para la linfopoyesis en ratones (10-12).

### Materiales y métodos

Los ratones hembra BALB/c de 8 a 12 semanas de edad se mantuvieron bajo condiciones estériles y se alimentaron ad libitum. Se dividieron en tres grupos conformados por cinco ratones cada uno: el grupo de control, que no recibía tratamiento; el grupo al que se le administraba solo 1 ml de suero fetal bovino (SFB) (vehículo), y el grupo en tratamiento, que recibía 0,1 g de caseinato de sodio en 1 ml de SFB al 10 % (p/v). Los de este último grupo, se inyectaron cuatro veces, con intervalos de 48 horas, por vía intraperitoneal. Los ratones fueron sacrificados a las 24 horas de la última inyección mediante dislocación cervical para obtener las células.

### Obtención de células mononucleares de médula ósea

Después del sacrificio de los ratones, se obtuvieron los fémures en una campana de cultivo previamente desinfectada con alcohol al 70 % y esterilizada durante 20 minutos con luz ultravioleta (UV). Los fémures se colocaron en cajas de Petri con medio de Iscove. Posteriormente, se cortaron las epífisis de cada fémur de los dos grupos, evitando que se astillaran y, con una jeringa de insulina de 1 ml con medio de Iscove con suplemento de suero bovino fetal (SBF) al 10 % (p/v), se extrajeron las células totales de la médula ósea.

La suspensión celular se centrifugó para obtener los botones celulares de cada grupo, los cuales se colocaron cuidadosamente en tubos cónicos con un gradiente de densidad a base de Ficoll® (1,077 g/L, Sigma, México) y se centrifugaron por 20 minutos a 500g para obtener las células mononucleares (CMN). Por último, estas se lavaron tres veces con medio de Iscove y SBF al 10 % para su posterior análisis.

### Obtención de células mononucleares de bazo

Los bazos se envolvieron en un filtro, se depositaron en cajas de Petri con 4 ml de medio de Iscove, y se exprimieron con un émbolo de jeringa hasta liberar las células sanguíneas. La suspensión celular se centrifugó para obtener el botón celular de cada grupo, el cual se colocó en tubos con 2 ml de medio de Iscove y SFB al 10 %. Posteriormente, las células obtenidas se depositaron en tubos cónicos con gradiente de densidad para obtener las células mononucleares. de la misma manera que las de médula ósea. Al finalizar este procedimiento, se obtuvo un anillo celular de cada muestra que contenía las células mononucleares, las cuales se lavaron dos veces con medio de Iscove y SFB al 10 % y, por último, se contaron.

# Ensayos de proliferación mediante citometría de flujo

Para los ensayos de proliferación, tan solo se consideraron el grupo de control, que recibió el vehículo, y el de estudio, tratado con caseinato de sodio. Después de administrarles el vehículo o el caseinato de sodio, los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal con bromodeoxiuridina (2 mg de BrdU por animal) (BD Bioscienses, San Diego, CA, USA) y se sacrificaron a las 24 horas de la última dosis.

Las células mononucleares se obtuvieron de la médula ósea y el bazo mediante gradiente de densidad con Ficoll® (1,077 g/L) (Sigma, México). Posteriormente, la densidad celular se ajustó a 2X106 en 1 ml de SFB y las células se tiñeron con anti-B220 marcado con Cy5 para el linaje linfoide B. Se requirieron 50.000 células por muestra para cada análisis.

Para detectar la proliferación del linaje, las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con anti-BrdU marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), según el protocolo del manual de procedimiento del estuche de BrdU para citometría de flujo (BD Bioscienses, San Diego, CA, USA) (6). Al finalizar la tinción, las células se volvieron a suspender en 0,3 ml de paraformaldehído al 1 % en SFB.

Los análisis del fenotipo celular y la incorporación de BrdU se hicieron en un citómetro FACS Calibur™ (Becton Dickinson, San José, CA, USA) con el programa Pro v.5.1.1 BD (Becton Dickinson), según las instrucciones del manual de procedimientos.

### Detección de citocinas

Para detectar la interleucina IL-7, se obtuvo sangre fresca del plexo axilar de los ratones tratados y de los no tratados con caseinato de sodio. Una vez obtenida la sangre de los ratones, se centrifugó durante 10 minutos a 1.500 rpm para obtener el suero. Posteriormente, se evaluó la concentración de IL-7 en el suero, respetando el procedimiento del kit de ELISA (Mouse Interleukin 7, Immunoassay, R&D Systems, MN, USA) durante las dos horas posteriores al sacrificio (6). La lectura de las placas se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro Tecan (Tecan Spectra, Austria).

### Análisis estadístico

En el presente estudio los datos se presentaron como la media y la desviación estándar de los obtenidos de manera independiente, por lo menos, de tres experimentos. Para detectar las diferencias significativas entre los datos, se empleó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnet (p<0,05) mediante el paquete estadístico SPSS®.

# Autorización del comité de ética para la experimentación en animales

Los ratones se mantuvieron en condiciones estériles en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética de dicha Facultad (número FESZ/DEPI/CI/128/14), y se ajustaron a las leyes y normas mexicanas para el trato y la protección de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) (13).

### Resultados

El caseinato de sodio disminuyó la incorporación de BrdU en linfocitos B de la médula ósea.

Para establecer si el caseinato de sodio influía en los linfocitos B, se evaluaron mediante citometría de flujo la granularidad, el tamaño y, posteriormente, la positividad frente al anticuerpo específico de linaje B, el anti-B220; asimismo, se utilizó el BrdU para evaluar la proliferación tras la inyección intraperitoneal del caseinato. Los resultados mostraron que el número de linfocitos en la médula ósea disminuyó en los ratones que recibieron caseinato de sodio, en comparación con los que solo recibieron el vehículo (11,33±1,15 Vs. 18,66±2,08) (figura 1, A y B). También, se observó que el porcentaje de incorporación de BrdU disminuyó (32,03±2,64 Vs. 50,33±4,50) (figura 1C).

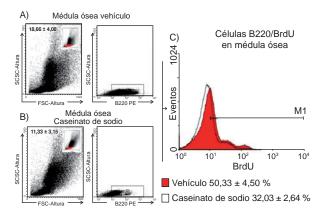


Figura 1. A y B. La invección intraperitoneal con caseinato de sodio disminuyó el porcentaje de células correspondiente al linaje linfoide en médula ósea, así como la incorporación de BrdU. Se presentan diagramas de puntos representativos de células mononucleares totales provenientes de ratones tratados solo con el vehículo o con caseinato de sodio. La selección se hizo mediante la evaluación de la granularidad y el tamaño de la región correspondiente al linaje linfoide, y la positividad frente al anticuerpo B220 de células seleccionadas previamente de la región correspondiente al linaie. C. Evaluación del porcentaie de incorporación de BrdU en células B220 positivas provenientes de células mononucleares de médula ósea de ratones tratados con caseinato de sodio y de ratones no tratados con este. Los números representan el porcentaje de BrdU incorporado en las células ± desviación estándar (DE) (de la marca M1). Los datos corresponden a, por lo menos, tres experimentos realizados de manera independiente, con tres ratones cada uno.

# El caseinato de sodio aumentó la incorporación de BrdU en linfocitos B del bazo.

Se sabe que en los ratones el bazo es un órgano hematopoyético secundario capaz de sostener la hematopoyesis (14-16), por lo que se evaluó si el caseinato de sodio tenía algún efecto sobre los linfocitos B. Los resultados demostraron que el número de células correspondiente a la región de los linfocitos se incrementaba en los ratones que habían recibido el caseinato, en comparación con los que solo recibieron el vehículo (89,01±1,03 Vs. 75,66±2,08) (figura 2 A y B), Asimismo, se observó un incremento en la incorporación de BrdU en estas células (38,59±4,48 Vs. 11,82±1,04) (figura 2 C).

# El caseinato de sodio aumentó la concentración de IL-7 en suero.

Una citocina clave en la linfopoyesis B del ratón es la IL-7 (10,17,18), por lo cual se evaluó su concentración en el suero de los ratones tratados con caseinato de sodio y de los no tratados. Los resultados mostraron que la concentración de IL-7 aumentó considerablemente en el suero de los ratones tratados con el caseinato, comparados con los que solo recibieron el vehículo (62,1±17,5 Vs. 26,9±4,4).

### Discusión

La caseína, principal proteína de la leche, y su sal, el caseinato de sodio, han servido como modelos de agentes proinflamatorios al inyectarlos por vía intraperitoneal, desde hace más de 20 años (1,2,7). Se ha demostrado que promueven la migración de granulocitos, monocitos y linfocitos en el sitio de inyección y que incrementan la concentración de las citocinas que influyen en la mielopoyesis, como GM-CSF, M-CSF y G-CSF en suero y exudado de la cavidad peritoneal (1,7).

En otro estudio, se demostró que el caseinato de sodio en células de origen mieloide, como los granulocitos, induce la producción de M-CSF *in vitro* (3). Se ha observado que, tras su inyección, también aumenta la migración de células madre hematopoyéticas a sangre periférica (4) y que, además, los péptidos de la caseína inducen la proliferación de linfocitos B *in vitro* (8).

En nuestro grupo de trabajo se ha podido demostrar que la administración intraperitoneal de caseinato de sodio induce la granulopoyesis *in vivo* e incrementa el G-CSF y el GM-CSF en suero (6).

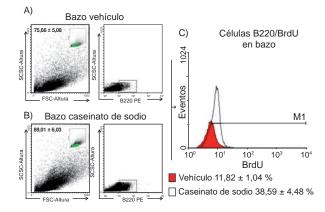


Figura 2 A y B. El tratamiento intraperitoneal con caseinato de sodio aumentó el porcentaje de células correspondiente al linaje linfoide en bazo, así como la incorporación de BrdU. Se presentan los diagramas de puntos representativos de las células mononucleares totales provenientes de ratones tratados solo con el vehículo y de aquellos tratados con caseinato de sodio. La selección se hizo mediante la evaluación de la granularidad y el tamaño de la región correspondiente al linaje linfoide y de la positividad frente al anticuerpo B220 de las células seleccionadas previamente de la región correspondiente al linaje. C. Evaluación del porcentaje de incorporación de BrdU en células B220 positivas provenientes de células monocucleares de bazo de ratones tratados con caseinato de sodio y de aquellos que no fueron tratados. Los números representan el porcentaje de BrdU incorporado en las células ± desviación estándar (DE) (de la marca M1). Los datos presentados corresponden, por lo menos, a tres experimentos realizados de manera independiente con tres ratones cada uno.

En este estudio se demostró que, tras la inyección de 1 ml de caseinato de sodio (10 % p/v en SFB) cada 48 horas durante seis días, el número de linfocitos B en la médula ósea disminuyó, en tanto que, en el bazo, aumentó.

Este efecto concuerda con los resultados publicados por el grupo de Ueda, *et al.*, quienes demostraron que, en un proceso inflamatorio, el aumento de la proliferación se presenta principalmente en el linaje de los granulocitos, lo cual influye en la disminución de linfocitos B en este órgano (19,20).

Por otro lado, en este trabajo se observó que, si bien el número de linfocitos B en médula ósea disminuía (figura 1 A y B), se incrementaba en el bazo (figura 2 A y B), y no solo eso, pues también aumentó el porcentaje de incorporación de BrdU en los linfocitos B, lo cual podría ser indicativo de proliferación (figura 2 C) y concuerda con lo observado *in vivo* (8,9). También, se sabe que las citocinas son fundamentales para la generación de células de origen hematopoyético; tal es el caso de la IL-7, la cual tiene un papel fundamental en la linfopoyesis de células B (11,12,18).

En el presente estudio, se demostró que la concentración de IL-7 se elevó en el suero de los ratones tratados con caseinato de sodio, en comparación con el de aquellos que solo recibieron el vehículo. Previamente, nuestro grupo de trabajo había reportado que, después de la inyección intraperitoneal de caseinato de sodio, se promovía la granulopoyesis en la médula ósea, y los resultados obtenidos en este estudio sugieren que, tras la granulopovesis generada por el caseinato. los linfocitos B posiblemente migran al bazo y allí proliferan, ya que en este órgano dicho evento ocurre de manera natural en ratones, con lo cual se mantiene la homeostasis inmunológica (14,21), y se ha demostrado que, tras la activación de la médula ósea, esta induce la migración al bazo de células madre multipotenciales con capacidad proliferativa (22,23), evento que pudiera verse favorecido por el incremento en la concentración de G-CSF y de IL-7 después de la invección intraperitoneal del caseinato de sodio.

### Agradecimientos

A Oswaldo Silvestre Santana, por la asistencia técnica en los experimentos.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

### Financiación

Este trabajo se hizo con el apoyo del programa de PAPIIT (IN217407, IN225610, IN220814) de la Universidad Nacional Autónoma de México, y con la beca escolar de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

### Referencias

- Lotem J, Sachs L. Control of in vivo differentiation of myeloid leukemic cells. Leukemia. 1988;2:24s-37s.
- Lotem J, Sachs L. Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins: *In vivo* regulation by compounds that induce inflammation. Int J Cancer. 1985;35:93-100.
- Santiago-Osorio E, Mora L, Bautista M, Montesinos JJ, Martínez I, Ramos-Mandujano G, et al. Sodium caseinate induces secretion of macrophage colony-stimulating factor from neutrophils. Immunobiology. 2010;215:332-9. https:// doi.org/10.1016/j.imbio.2009.03.003
- Córdova-Galaviz Y, Ledesma-Martínez E, Aguíñiga-Sánchez I, Soldevila-Melgarejo G, Soto-Cruz I, Weiss-Steider B, et al. Sodium caseinate induces increased survival in leukaemic mouse J774 model. In Vivo. 2014;28: 819-25.
- Santiago-Osorio E, Ledesma-Martínez E, Aguiñiga-Sánchez I, Poblano-Pérez I, Weiss-Steider B, Montesinos-Montesinos JJ, et al. Sodium caseinate (CasNa) induces mobilization of hematopoietic stem cells in a BALB/c mouse model. Med Sci Monit Basic Res. 2015;21:206-12. https:// doi.org/10.12659/MSMBR.895442
- Domínguez-Meléndez V, Silvestre-Santana O, Moreno-Fierros L, Aguiñiga-Sánchez I, Martínez L, Marroquín-Segura R, et al. Sodium caseinate induces mouse granulopoiesis. Inflamm Res. 2012;61:367-73. https://doi.org/10.1007/s00011-011-0421-7
- Metcalf D, Robb L, Dunn AR, Mifsud S, Di Rago L. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. Blood. 1996;88:3755-64.
- Wong CW, Seow HF, Liu AH, Husband AJ, Smithers GW, Watson DL. Modulation of immune responses by bovine beta-casein. Immunol Cell Biol. 1996;74:323-9. https://doi. org/10.1038/icb.1996.58
- Tobita K, Kawahara T, Otani H. Bovine beta-casein (1-28), a casein phosphopeptide, enhances proliferation and IL-6 expression of mouse CD19+ cells via Toll-like receptor 4. J Agric Food Chem. 2006;54:8013-7. https://doi.org/10.1021/ jf0610864
- Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. Annu Rev Immunol. 2006;24:657-79. https://doi.org/10.1146/annurev. immunol.24.021605.090727
- Sitnicka E, Bryder D, Theilgaard-Mönch K, Buza-Vidas N, Adolfsson J, Jacobsen SE. Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. Immunity. 2002;17:463-72. https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00419-3

- Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptordeficient mice. J Exp Med. 1994;180:1955-60. https://doi. org/10.1084/jem.180.5.1955
- 13. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Fecha de consulta: 15 de enero de 2010. Disponible en: http://www. ibt.unam.mx/computo/pdfs/bioterio.NOM-062.pdf
- 14. Bertrand JY, Giroux S, Golub R, Klaine M, Jalil A, Boucontet L, et al. Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:134-9. https://doi.org/10.1073/pnas.0402270102
- Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. Annu Rev Immunol. 2005;23:127-59. https://doi.org/10.1146/annurev. immunol.23.021704.115628
- Fu YX, Chaplin DD. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. Annu Rev Immunol. 1999;17: 399-433. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.399
- Dias S, Silva H Jr, Cumano A, Vieira P. Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. J Exp Med. 2005;201:971-9. https:// doi.org/10.1084/jem.20042393

- Milne CD, Paige CJ. IL-7: A key regulator of B lymphopoiesis. Semin Immunol. 2006;18:20-30. https://doi.org/10. 1016/j.smim.2005.10.003
- Ueda Y, Yang K, Foster SJ, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. J Exp Med. 2004;199:47-58. https://doi.org/10.1084/jem.20031104
- Ueda Y, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. J Exp Med. 2005;201:1771-80. https://doi. org/10.1084/jem.20041419
- von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. J Exp Med. 1995;181:1519-26. https://doi.org/10.1084/jem.181.4.1519
- Morrison SJ, Wright DE, Weissman IL. Cyclophosphamide/ granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:1908-13
- Inra CN, Zhou BO, Acar M, Murphy MM, Richardson J, Zhao Z, et al. A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen. Nature. 2015;26:466-71. https://doi.org/10.1038/nature15530

#### **ACTUALIZACIÓN**

# Revisión comentada de la legislación colombiana en ética de la investigación en salud

Mónica María Lopera

Línea de Investigación en Sistemas de Salud, Grupo de Gestión y Políticas, Facultad Nacional de Salud Pública, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

La ética de la investigación en salud no se agota en el marco normativo y trasciende la Resolución 8430 de 1993. Las normas constituyen una herramienta fundamental que determina los estándares mínimos de protección de los sujetos de investigación y, por lo tanto, su conocimiento y aplicación, así como la reflexión sobre ellas, son deberes de todos los investigadores en salud.

En este texto se presentan y discuten desde un punto de vista analítico las normas para el ejercicio de la investigación en salud, entendiendo por salud un proceso multidimensional y por investigación en salud, un proceso multidisciplinario que trasciende este campo y abarca la investigación básica, la clínica y de salud pública, la colectiva y la de ciencias afines.

Las principales categorías analíticas que se presentan se relacionan con los principios y los participantes en la investigación, las entidades reguladoras, los comités de ética y los sujetos y poblaciones especiales o vulnerables, y con los códigos de ética profesional, el consentimiento informado y el tratamiento de los datos.

A pesar de los aportes de las normas éticas a la cualificación del ejercicio investigativo en salud, se concluyó que la normatividad vigente en Colombia debe actualizarse con respecto a los desarrollos técnicos y científicos y las especificidades de los diversos tipos de investigación en salud.

Palabras clave: comités de ética en investigación; códigos de ética; ética basada en principios, ética clínica, ética profesional; legislación.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3333

# Commented review of the Colombian legislation regarding the ethics of health research

The scope of ethics in health research transcends its legal framework and the regulations established in Resolution 8430 of 1993. These norms represent a fundamental tool to determine the minimum protection standards for research subjects, and, therefore, they should be known, applied properly, and reflect upon by all researchers in the field.

Here I present and discuss from an analytical point of view the regulations that guide research in health. In this framework, health is understood as a multidimensional process, and research in health as a multidisciplinary exercise involving basic, clinical and public health research, collective health, and other related sciences.

The main analytical categories are related to the principles and actors involved in research (regulatory authorities, ethical committees, and special or vulnerable subjects and populations), and to professional ethics codes, in addition to informed consents and data management.

Despite the contribution of this legislation to the qualification of health research, my conclusion is that the national legislation in ethics for health research requires updating regarding technological and scientific developments, as well as specifications from the multiple types of health studies.

**Key words:** Research ethics committees; codes of ethics; principle-based ethics; ethics, clinical; ethics, professional; legislation.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3333

La ética de la investigación en salud debe entenderse como un proceso permanente de reflexión que atraviesa todo el ejercicio investigativo y no debe limitarse a consideraciones formales referentes a la información y la firma del consentimiento informado, como suele entenderse.

Correspondencia:

Mónica María Lopera, Calle 62 N° 52-51, Facultad Nacional de Salud Pública, oficina 306, Medellín, Colombia

Teléfono: (574) 219 6796; 301 5041515; fax (574) 219 6881 monica.lopera@udea.edu.co

mornica.lopera@udea.edu.co

Recibido: 10/05/16; aceptado: 21/12/16

La ética de la investigación abarca aspectos relacionados con quienes la realizan, las relaciones que se establecen entre las partes involucradas, la calidad técnica de la propuesta, las consideraciones de justicia y bienestar que se logran con la respuesta a la pregunta de investigación y la selección de los Lopera MM Biomédica 2017;37:577-89

participantes teniendo en cuenta sus contextos, así como el conocimiento alcanzado y los beneficios individuales, colectivos, científicos y políticos que se alcanzan al poner dicho conocimiento al servicio de la sociedad.

Las normas éticas para ejercer la investigación en salud en Colombia se ajustan a otros códigos internacionales, como los emitidos por la Organización de las Naciones Unidas y otras asociaciones de ciencias médicas y sociales. Estas normas, tanto de carácter general como particular, pretenden proteger a las poblaciones de los abusos cometidos históricamente en las investigaciones, principalmente contra las poblaciones más vulnerables; sin embargo, no carecen de contradicciones e intereses en conflicto.

En este ensavo se presentan y discuten, desde un punto de vista analítico, las normas que rigen el ejercicio de la investigación en salud, entendiendo por salud un proceso multidimensional y por investigación en salud, un proceso multidisciplinario que trasciende el sector y abarca la investigación básica, clínica y de salud pública, salud colectiva y ciencias afines. Para ello se consultaron la Constitución Política de Colombia y la Resolución 8430 de 1993 como referente general de la ética de la investigación en salud. También se consultaron el Código Civil colombiano, las leyes sobre el trabajo que atañen a las instituciones donde se hace investigación (custodia y manejo de la historia clínica, códigos éticos de las distintas profesiones), así como la Ley de protección de datos personales. Por último, se hace referencia a los vacíos y retos de la legislación a la luz de los cambios científicos y globales contemporáneos.

# Constitución Política de Colombia: de los principios y derechos

La Constitución Política de Colombia es la norma de normas. En ella se acogen los principios compartidos por la ética referidos a la autonomía, el respeto, la justicia, la equidad y la universalidad, entre otros (1). Aunque contradictoria en el sentido de que promulga el principio de universalidad al tiempo que determina poblaciones específicas, la Constitución Política considera la protección de los derechos civiles y políticos, los derechos económicos, sociales y culturales y los derechos fundamentales que deben respetar los investigadores y todos los que participan en el proceso de investigación. Entre aquellos de especial relevancia para la investigación, deben mencionarse la protección de la vida, la igualdad, la no discriminación, la protección especial a poblaciones en condiciones de vulnerabilidad, la

intimidad y las libertades de desarrollo, de conciencia y de expresión. El concepto de vulnerabilidad es relativo y ha sido ampliamente discutido en la ética de la investigación en salud. Así, aunque es cierto que algunos segmentos poblacionales están sometidos a factores estructurales determinantes que se relacionan con condiciones de vida y pobreza que les restan autonomía, el calificativo taxativo de grupo vulnerable tal como se describe en las guías internacionales implica etiquetas que no necesariamente atienden a condiciones particulares. En este sentido, Luna ha propuesto relativizar la designación de vulnerable mediante el análisis de capas de vulnerabilidad para determinar el grado de autonomía que tiene el potencial participante (2) y Del Percio ha llamado la atención sobre el riesgo de hacer doblemente vulnerables a las poblaciones denominadas a priori como tal, excluyéndolas del potencial beneficio que puede traer la investigación en estos grupos (3).

La Constitución también define la organización del Estado y de las instituciones asociadas en los distintos niveles territoriales según el principio de la descentralización. Asimismo, asigna al Ministerio de Salud y de Protección Social la función de emitir las políticas y las normas de la ética de la investigación tendientes a proteger la vida, la integridad y la dignidad de los participantes, así como el goce de sus derechos y libertades.

Aunque sus enunciados se plantean como universalistas, en la Constitución se enfatiza la protección especial de las poblaciones consideradas vulnerables, así como la identidad cultural de los pueblos indígenas, afrodescendientes, raizales y gitanos o pueblo Rom. El énfasis en la protección de dichas poblaciones se desprende de los abusos de los que han sido víctimas históricamente. Su consideración debe abordarse con sumo cuidado para evitar que las personas sean explotadas en virtud de sus condiciones de desventaja, o que, por el contrario, se niegue su participación en las investigaciones, y por esta vía se exacerbe la discriminación y la exclusión de grupos sobre los cuales se requiere mayor información procedente de estudios científicos. Por lo tanto, es deber del investigador observar con rigor el proceso de vinculación de los participantes.

En consonancia con la Constitución Política, Colombia ha adherido a los tratados internacionales que forman parte de su bloque de constitucionalidad (4), así como a otros códigos internacionales propios de la ética de la investigación que constituyen

referentes para reducir los vacíos existentes. Entre los tratados más importantes se encuentran la Declaración Universal de los Derechos Humanos (5) y la Declaración de los Derechos del Niño (6), las cuales contienen los fundamentos de la protección de los derechos universales.

En materia de ética de la investigación en salud, el país tiene a su disposición algunas guías y pautas internacionales que han servido de marco de referencia para su desarrollo. Sin embargo, ante los escasos esfuerzos que se han adelantado en el campo de la salud pública y las ciencias sociales para definir estándares y códigos éticos para la investigación, se suelen acoger aquellos provenientes de las ciencias biomédicas.

Sin pretender una descripción exhaustiva, es posible mencionar las siguientes normas éticas internacionales: el Código de Núremberg (7), la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (con sus actualizaciones) (8), el Informe Belmont (9), las Pautas Éticas del Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) (10,11), las Pautas Internacionales para la Evaluación de Ética de los Estudios Epidemiológicos (12), la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos (13), las guías operacionales que evalúan la investigación biomédica (14), las Directrices y Recomendaciones para las Comisiones Éticas Europeas (15) y las Normas de la Buena Práctica en Investigación Bioclínica (16), entre otras. En el caso de las ciencias sociales y humanas, algunos referentes pueden encontrarse en la American Psychological Association (APA) (17) y la American Sociological Association (ASA) (18). Por el dinamismo de la ciencia y los nuevos interrogantes que plantea, algunas de estas guías han sido revisadas y, por lo tanto, se han publicado nuevas versiones.

En otros códigos internacionales se cuenta con referentes de aplicación específica en el ámbito de las áreas básicas y clínicas que, en respuesta a los nuevos desarrollos y conocimientos, ahondan en la importancia de la ciencia y definen los límites de su práctica. En este contexto, los investigadores en estas áreas deben conocer y acatar el Protocolo del Convenio de Derechos Humanos y Biomedicina sobre Prohibición de Clonar Seres Humanos (19), la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos (20), la Declaración de Budapest sobre la Ciencia y el Uso del Saber Científico (21) y la Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos (22), entre otros. Asimismo, otras asociaciones especializadas han

divulgado declaraciones para la protección de sujetos en condiciones particulares, por ejemplo, aquellos con discapacidades, poblaciones indígenas, o poblaciones con enfermedad avanzada (23-25).

# Normas básicas que regulan la ética de la investigación en Colombia

En Colombia la Resolución 8430 de 1993 (26) es la norma marco para la investigación en salud. No existe una norma con fuerza de ley que se ocupe de los importantes temas que hoy son objeto de debate en bioética y, en especial, de aquellos concernientes a la ética de la investigación en salud, a pesar de la proliferación de investigaciones en este campo y el consecuente aumento de riesgos para la población.

La Resolución 8430 ofrece las condiciones mínimas y los aspectos formales para el desarrollo de las investigaciones. De este modo, la ética de la investigación como proceso de reflexión transversal a todo el ejercicio investigativo, abarca múltiples asuntos que incluyen los marcos epistémicos sobre los objetos de investigación y, por lo tanto, las valoraciones y los principios bajo los que el investigador se mueve; las competencias de los comités de ética y de las entidades reguladoras; las cualidades del talento humano; el respeto por la confidencialidad y la autonomía; la definición, clasificación, previsión y control de los riesgos asociados a la investigación; el cuidado que se precisa en el trabajo con poblaciones especiales o vulnerables; los estándares y procedimientos propios de la investigación con tecnologías clínicas, farmacológicas y genéticas, y, por último, la investigación con animales y aquella que produzca un impacto en el ambiente. Además de todo esto, el marco normativo colombiano incluye los contenidos y calidades del consentimiento informado, los derechos referentes a la información y su titularidad (la investigación con fuentes secundarias, la protección de datos personales, la transferencia de datos y muestras y el uso de las tecnologías de la información y la comunicación), así como los elementos relacionados con la difusión del conocimiento.

Además de la Resolución 8430, estos asuntos están incluidos en otras normas que el investigador de las áreas de salud y ciencias sociales debe conocer y aplicar, pues son de carácter vinculante. Entre ellas se cuentan el Código Civil y las leyes sobre talento humano. A esto se añaden las normas que definen los procedimientos institucionales y la protección de datos clínicos derivados del manejo de la historia clínica (reglamentada por la Resolución 1995 de

Lopera MM Biomédica 2017;37:577-89

1999), así como la Ley estatutaria de *habeas data*, entre otras. Los procesos ya enunciados se analizan a continuación bajo sus respectivos marcos normativos.

# Marco epistémico, tipos de investigación y contenidos

A pesar de haber sido emitida hace 23 años, la Resolución 8430 reconoce los procesos biológicos y psicológicos como elementos de la salud del individuo. Esta norma se refiere a la investigación que se realiza en todas las fases de la atención integral, es decir, la prevención, el diagnóstico, el tratamiento y la rehabilitación. Por último, aunque someramente, también indica aquellos aspectos relacionados con una tríada socio-sanitaria importante: las causas del proceso de salud y enfermedad, la práctica médica y los asuntos relacionados con la estructura social.

Con relación a los tipos de investigación considerados, dicta pautas para la investigación básica y clínica, y de forma muy preliminar ofrece algunas directrices para el desarrollo de investigaciones en salud pública, salud comunitaria y áreas afines. Con respecto a los contenidos, esta norma alude a algunos de los desarrollos técnico-científicos correspondientes a la época de su expedición; al respecto establece directrices sobre la investigación farmacológica, las investigaciones de tejidos y componentes biológicos, los isótopos radioactivos y los dispositivos generadores de radiaciones ionizantes y electromagnéticas, las investigaciones en animales, la investigación con elementos como los recursos profilácticos, de diagnóstico, terapéuticos y de rehabilitación, así como con microorganismos patógenos o material biológico. Dado que se expidió hace más de dos décadas, no abarca algunos temas contemporáneos que hoy son objeto de debate mundial: la justicia distributiva, la investigación global, los desarrollos científicos que incluyen el trabajo con células madre y la reproducción asistida y la genómica, entre otros.

#### **Principios**

En cuanto a los principios, la resolución destaca la protección de los sujetos frente a riesgos o daños derivados de la investigación y determina la importancia de la asignación imparcial de los sujetos, la protección de su privacidad, el anonimato, el derecho a la información, la autonomía y la libertad, condiciones todas que deben respetar quienes participen en la investigación y que deben quedar claramente pactadas en el consentimiento informado.

Asimismo, de forma consecuente con la carta política y otras normas internacionales, enfatiza la obligación de respetar los aspectos socioculturales y de proteger a las personas en condiciones especiales, como las mujeres gestantes, las personas con autonomía restringida, los menores de edad, los discapacitados físicos y mentales y los grupos subordinados. También reglamenta sobre la seguridad biológica del investigador, la comunidad y el ambiente en los casos de investigaciones con agentes patógenos potenciales, así como sobre las condiciones de seguridad y cuidado de los animales de experimentación.

### Comités de ética y entidades regulatdoras

La Resolución 8430 de 1993, expedida como reglamentación de la operación del antiguo Sistema Nacional de Salud, designa a los comités de ética de la investigación, al Invima (en los casos de investigación clínica o de alto riesgo) y al Ministerio de Salud como entidades encargadas de aprobar los protocolos y de resolver los problemas y dilemas éticos que surjan alrededor de la investigación en salud. Asimismo, define la estructura de los que participan en investigación, junto con sus competencias y obligaciones durante su ejecución, y delega en el Ministerio de Salud y sus organismos asociados la función de autoridad reguladora. Como entidad rectora del sistema de salud, el Ministerio de Salud es el organismo encargado de autorizar las investigaciones clasificadas como de riesgo III y IV. Según el artículo 67 de la Resolución 8430 de 1993, las investigaciones del grupo de riesgo III incluyen el trabajo con microorganismos que representan riesgo elevado para el individuo y escaso para la comunidad y aquellas de riesgo IV, las que utilizan microorganismos que representan riesgo elevado para el individuo y para la comunidad. El Invima es responsable de evaluar los protocolos de las investigaciones clínicas que se realicen en el país, de hacer seguimiento a las investigaciones y de expedir el certificado en buenas prácticas clínicas a las instituciones prestadoras de salud (IPS) que hagan investigaciones clínicas con medicamentos.

La Resolución 13437 de 1991 constituyó los comités de ética hospitalaria y adoptó el decálogo de los derechos de los pacientes. Esta norma definió la confirmación de los miembros, sus funciones y algunos mecanismos de funcionamiento, entre ellos, la obligatoriedad de remitir las actas de sus reuniones al Ministerio de Salud y Protección Social (27).

# Ética profesional y talento humano para la investigación en salud

Los códigos deontológicos de las profesiones de la salud o de las áreas sociales con incidencia en la salud sirven como marco para proteger la ética de la investigación científica, independientemente de que se realice en circunstancias relacionadas con la práctica asistencial cotidiana, o no. A menudo los espacios de la práctica asistencial son los escenarios principales para el contacto con los participantes y la recolección de información de fuentes primarias y secundarias. Además, en muchos casos, los investigadores son los mismos profesionales encargados de la atención social o sanitaria.

Existen, al menos, dos elementos importantes de estos códigos: el primero se relaciona con la idoneidad profesional, y el segundo, con el comportamiento que se espera de los profesionales durante el desarrollo de su labor.

El ejercicio investigativo exige contar con el talento humano técnicamente capacitado. Es función de los comités de ética de la investigación velar porque el talento humano sea el adecuado a las condiciones y necesidades de la investigación. Para el desempeño en investigación no solo hace falta demostrar aspectos formales relacionados con los títulos obtenidos, también debe verificarse la experiencia, la idoneidad y la actualización. En este aspecto, el país ha comenzado a establecer las condiciones para formalizar la recertificación de los profesionales. Por otra parte, las condiciones normativas sobre el talento humano son objeto de discusión por parte del Consejo Nacional del Talento Humano (28).

La Ley 1164 del 2007 (artículo 34) (28) establece los principios, valores, derechos y deberes de las profesiones y las ocupaciones en salud; entre ellos se destaca el cuidado respetuoso de la vida y la dignidad de cada ser humano y la promoción de su desarrollo existencial procurando su integridad física, genética, funcional, psicológica, social, cultural y espiritual, sin distinciones de ningún tipo. Además de los principios dictados por la Constitución, los principios y valores éticos y bioéticos demandan de los profesionales apegarse a la verdad, la prudencia y el buen trato en la relación entre médico y paciente, a la beneficencia, el mal menor, la no maleficencia, la totalidad, y el respeto por la igualdad y la autonomía, principios que constituyen, a su vez, el objeto y sentido de la bioética.

En el ejercicio de su práctica, el personal de salud tiene derechos y deberes. Es derecho del investigador optar por la objeción de conciencia y recibir

un trato respetuoso, mientras que son sus deberes la protección de los lazos afectivos del paciente, la promoción de una cultura ética, la reserva con los fármacos, productos y técnicas desconocidas (cuando se conocen los daños que producen o se tienen dudas sobre sus efectos), la priorización de los valores por encima de los intereses de terceros y, en general, la responsabilidad de aplicar la ética v la bioética en salud (28). Otras leves más recientes, como la ley estatutaria que regula el derecho fundamental a la salud, refrendan estos principios y orientaciones (29). Estos requisitos obligan al personal investigador a actualizarse en torno a los procesos propios de su profesión y a los del complejo mundo de la bioética, así como a reflexionar críticamente sobre su quehacer y a asumir una postura ética en favor del respeto por los derechos y la justicia social.

El análisis detallado de los códigos éticos profesionales en el país permite afirmar que su aplicación a las prácticas de investigación con sujetos humanos en ambientes asociados al ejercicio médico es conflictiva porque cuestiona la real autonomía del individuo y propone el paternalismo médico, además de que impone retos frente a la distribución de recursos, pone en riesgo la confidencialidad v la privacidad, y puede inducir a malentendidos terapéuticos. El malentendido terapéutico es un término técnico utilizado para referirse a la confusión de un paciente cuando es invitado a participar en una investigación y erróneamente la concibe como parte de su proceso terapéutico porque se realiza en el contexto de la práctica clínica. Todas estas situaciones son objeto de análisis y controversia en el campo de la ética de la investigación en el mundo.

Las normas referidas están relacionadas con los siguientes aspectos: 1) la obligación del médico de someter al paciente a tratamientos médicos o quirúrgicos que se justifiquen; 2) el uso de procedimientos experimentales cuando se planteen como la única posibilidad de salvación, lo cual debe efectuarse con autorización del paciente o sus familiares responsables y, si es posible, por acuerdo en junta médica, y 3) la obligación de utilizar los métodos y medicamentos a su disposición mientras subsista la esperanza de aliviar o curar la enfermedad, pero no cuando exista diagnóstico de muerte cerebral. Estos aspectos están relacionados con la biopolítica y la concepción paternalista de los profesionales de la salud y, por supuesto, tienen implicaciones legales. Para ampliar estas teorías se sugiere consultar a Luna (30), Mulhe y Foucault (31,32).

Lopera MM Biomédica 2017;37:577-89

#### Confidencialidad y autonomía

Otros aspectos del proceso de investigación que constituyen puntos medulares de la ética profesional se refieren a la confidencialidad y la autonomía del participante. En la Resolución 13437 de 1991 y en otras normas éticas, se explicita el derecho de los pacientes a participar en las investigaciones o a negarse a hacerlo previa información suficiente de los objetivos y condiciones del estudio (27). Esto implica el reconocimiento de las condiciones relativas a la autonomía del participante (26,27).

Los códigos de ética profesional permiten revelar el secreto profesional al enfermo "en aquello que estrictamente le concierne o convenga", y a los familiares o cónyuges del enfermo si la revelación es útil para el tratamiento o impide que se pongan en peligro la vida del cónyuge o de su descendencia, y a las autoridades judiciales o de higiene y salud en los casos previstos por la ley. Este es uno de los dilemas éticos más comunes a lo que se enfrentan los investigadores involucrados en la práctica clínica, así como en estudios de salud pública, salud comunitaria y áreas afines.

En estos casos problemáticos, que implican el conocimiento del participante de la afectación a terceros, la ética de la investigación se ve comprometida y exige que los investigadores, los profesionales y el personal asistencial en el caso de la práctica clínica y los estudios sociales conozcan con claridad cuáles estándares de autonomía y confidencialidad implementarán según el objeto de la investigación que estén desarrollando, y si estiman conveniente la revelación del diagnóstico o la denuncia de situaciones problemáticas, ello debe consignarse debidamente en el consentimiento informado.

# Definición, clasificación, previsión y control de los riesgos asociados a la investigación

Cada vez que las investigaciones incluyen intervenciones (estudios experimentales), o que indagan por elementos o temas sensibles, existe la posibilidad de generar riesgos o efectos secundarios indeseables de naturaleza física, psicológica, emocional, familiar, institucional o social. Como procedimiento estándar, toda investigación debe definir el tipo de riesgo y no como un mero formalismo; se trata de que los investigadores determinen los riesgos antes, durante y después del estudio, valoren sus implicaciones, tanto para los participantes como para la comunidad a la que

pertenecen y para ellos mismos. Es responsabilidad del investigador implementar todas las medidas que tiendan a reducirlos, mitigarlos o eliminarlos.

En este sentido, en la Resolución 8430 se definen tres categorías: sin riesgo, de riesgo mínimo y de riesgo mayor al mínimo. La norma reserva la categoría de investigación sin riesgo para los estudios observacionales, retrospectivos y documentales, así como aquellos que no aborden aspectos sensibles de la conducta de los participantes. El riesgo mínimo lo circunscribe a las intervenciones que implican procedimientos constitutivos de estándares básicos de cuidado físico y psicológico que no impliquen intervenciones invasivas. Por último, define las investigaciones con riesgo mayor al mínimo como los ensayos clínicos o las investigaciones que realizan intervenciones invasivas, que tienen mayores probabilidades de afectar al sujeto o que usan nuevas tecnologías.

A pesar de la aparente claridad en los criterios para definir el riesgo, esta clasificación resulta más apropiada para la investigación clínica porque los efectos físicos pueden ser más tangibles, pero resulta limitada a la luz de las investigaciones en salud pública, salud comunitaria y áreas afines debido a las particularidades de su objeto, las cuales no se abordan aquí por desbordar el objetivo de este escrito. En materia de la determinación y el manejo del riesgo, las normas éticas nacionales son incipientes y solo mencionan la necesidad de suspender la investigación en caso de que sea necesario, tratar a quienes pudieran resultar afectados en su desarrollo y rendir los reportes necesarios.

#### Investigación con grupos vulnerables

Tanto en los códigos éticos nacionales como internacionales se ha señalado la vulnerabilidad de algunos grupos o participantes con condiciones particulares. Tradicionalmente estos grupos han incluido a las mujeres (especialmente en estado de embarazo), a los niños, a las poblaciones privadas de la libertad o en condición de subordinación y a las minorías étnicas, a las personas con ciertas enfermedades y discapacidades, así como a aquellas que se encuentran al final de la vida (8,10). La Ley 23 de 1981 y la Constitución Política enfatizan sobre sus derechos y prohíben que estas poblaciones se utilicen con propósitos de investigación científica en contra de su voluntad. En consecuencia, advierten sobre los cuidados que deben procurarse en el desarrollo de las investigaciones (33). En la Resolución 8430 se sujeta la participación de niños y mujeres gestantes al cumplimiento de ciertas condiciones de la investigación. Los niños deben dar su asentimiento y los padres o tutores legales, el consentimiento informado. No obstante, según el Código Civil, los niños emancipados pueden otorgar su consentimiento informado.

Las instituciones que tengan algún tipo de responsabilidad para con sus miembros, como las instituciones educativas, las empresas o las entidades responsables de personas en confinamiento o dependencia, como los establecimientos penitenciarios, entre otros, deben velar por la garantía del beneficio para los grupos que les competen, y estos también deben velar porque los procedimientos se realicen en condiciones que protejan su integridad; por este motivo, deben dar su aval para el desarrollo de la investigación.

En instituciones responsables de personas dependientes o sujetas a relaciones jerárquicas, el consentimiento informado debe obtenerlo otro miembro del equipo de investigación con quien no exista dicha relación. En el caso de investigaciones con poblaciones indígenas, los líderes de la comunidad deben otorgar la autorización para la participación de la comunidad, pues a ellos les corresponde instaurar los mecanismos que protejan su vida y sus tradiciones, y eviten o minimicen los riesgos derivados de la investigación. Dadas las particularidades de cada grupo vulnerable y de los contextos variados en los que están inmersos, los investigadores que pretendan trabajar con ellos deben asegurarse de determinar las particularidades v sus implicaciones para así reducir los riesgos o profundizar, incluso más, su vulnerabilidad durante la investigación.

# Normas referentes a la investigación clínica, farmacológica y genética

La Resolución 8430 regula las investigaciones que incluyen experimentos con células recombinantes, transformación de organismos resistentes, isótopos radioactivos y otros que generen radiaciones ionizantes y electromagnéticas, y exhorta para que estas se realicen con las condiciones óptimas para evitar la diseminación, los daños ambientales y las posibles consecuencias para la salud. Este tipo de investigaciones, clasificadas en niveles de riesgo III y IV, requieren autorización del Ministerio de Salud. Es importante señalar que no se incluyen en esta norma los procesos de investigación de carácter industrial y agropecuario, aunque estos podrían tener efectos sobre la salud.

Además de las recomendaciones consideradas en la Resolución 8430 sobre la calidad científica de las investigaciones, en el país se adoptaron las recomendaciones de buenas prácticas clínicas (BPC) promulgadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), recomendaciones que se recogieron en la Resolución 2378 del 2008 (34).

En Colombia se designó al Invima para que evaluara los protocolos de las investigaciones clínicas que se realicen en el país, hiciera su seguimiento y expidiera el certificado en buenas prácticas clínicas a las instituciones prestadoras de servicios de salud (IPS) que hagan investigaciones clínicas con medicamentos. Esta certificación se expide después del cumplimiento de las normas de habilitación y el aval de un comité de ética de la investigación. Para expedir la certificación, el Invima evalúa al comité, a los investigadores, al patrocinador y al laboratorio clínico. Hasta la fecha, en el país se han certificado 125 IPS y 73 comités de ética adscritos a ellas, y cuatro centros de investigación han sido suspendidos (35).

Para velar por una ejecución segura de la investigación y garantizar así los derechos de los participantes, la Resolución 20764 sobre investigación farmacológica expedida por el Invima (36) establece los procedimientos para reportar eventos adversos serios y no serios generados en la fase de investigación clínica, así como los informes de seguridad que el investigador debe dirigir a los comités de ética y al propio Invima.

Una vez se ha demostrado la eficacia de los productos mediante los ensayos clínicos pertinentes, el Invima regula el régimen de registros, las licencias, el control de calidad y la vigilancia sanitaria de los medicamentos y otros productos de su competencia. Para ello debe velar por el cumplimiento de las normas farmacológicas aceptadas, así como por las evaluaciones farmacéuticas, farmacológicas y legales. Los registros están regulados por el Decreto 677 de 1995 (37), modificado mediante el Decreto 1505 del 2014 (38). La evaluación farmacológica, que en sí misma puede considerarse como investigación, determina la utilidad, conveniencia y seguridad de un medicamento, evaluación que está reglamentada por el Decreto 1290 de 1994 (39).

#### Investigación con animales

En las fases previas de la investigación clínica y de algunos ensayos en investigación psicológica es necesario el uso de animales vivos. En Colombia se permite el uso de animales en caso de que sean "imprescindibles para el estudio y avance de la ciencia, útiles para el control, la prevención, el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades que afecten al hombre o al animal y solo cuando se

Lopera MM Biomédica 2017;37:577-89

demuestre que los resultados no puedan obtenerse por otros procedimientos". Además de las normas internacionales que establecen los parámetros de la investigación con animales, el país se rige por el Estatuto Nacional de Protección de los Animales (Ley 84 de 1989) (40).

# Aspectos éticos de la investigación genética y su impacto en el ambiente

La Resolución 8430 de 1993 alude a las investigaciones con ácidos nucleicos, su construcción v manejo, pero su foco de interés es la contención biológica, a pesar de que la genómica y la manipulación genética plantean múltiples posibilidades, retos y preocupaciones. En el mundo crece la oferta de biobancos y centros de recursos biológicos (41) y, con ello, también se han establecido normas en el ámbito internacional (42). Mediante los avances científicos, hoy es posible obtener embriones humanos clónicos (43), así como inducir la eugenesia a partir de las tecnologías de reproducción asistida (44,45). Esta posibilidad plantea problemas éticos de gran envergadura desde el punto de vista social, cultural y económico. Aunque las implicaciones de tales desarrollos son asunto de reflexiones más profundas, baste decir que en la norma marco colombiana existen vacíos importantes que es necesario superar.

Anticipándose a los resultados potenciales de la ingeniería genética, la Comisión Intersectorial de Bioética ha establecido que: "Nadie podrá ser obieto de discriminación fundada en sus características genéticas, lo cual atentaría contra sus derechos humanos y libertades fundamentales y el reconocimiento de su dignidad". En esta declaración se acoge la prohibición de la clonación estipulada en el Protocolo al Convenio de Derechos Humanos y Biomedicina (19). Además de reconocer la libertad para realizar investigaciones y difundir los resultados, insta al Estado a favorecer el respeto y los debates abiertos que garanticen la libre expresión de las distintas corrientes de pensamiento socioculturales, religiosas y filosóficas en torno a estas investigaciones y, en especial, las relacionadas con la genética. La comisión recomienda, asimismo, el acatamiento de las normas básicas de carácter internacional que rigen la investigación en sujetos humanos v la protección del ambiente.

### El consentimiento informado

Mediante el consentimiento informado los investigadores informan y pactan claramente con el participante las condiciones en las que se realizará el estudio que los ocupa, lo cual implica un proceso

que incluye los procedimientos que se realizarán, los objetivos, beneficios y riesgos previsibles, así como la utilidad de la investigación; la afiliación institucional del investigador; la fuente de financiamiento; los posibles conflictos de intereses y los compromisos posteriores al estudio, entre otros (8). De esta forma, el participante potencial, en pleno uso de sus capacidades y su autonomía, puede tomar una decisión frente a su participación. El comité de ética debe velar por el cumplimiento de este derecho del sujeto y, en consecuencia, solicitar los procedimientos alternativos que den lugar a su protección.

En el caso de investigaciones comunitarias, la Resolución 8430 plantea la necesidad de obtener no solo el consentimiento informado de los individuos, sino también de las autoridades de salud, del representante legal de la institución investigadora v de la institución donde se realiza la investigación, así como de otras autoridades civiles de la comunidad (26). Por otra parte, se establece que si los individuos que conforman la comunidad no tienen la capacidad para comprender las implicaciones de la participación en una investigación, el consentimiento informado lo podrá otorgar una "persona confiable, con autoridad moral sobre la comunidad". Aunque la pretensión básica de esta disposición sea la protección del sujeto, tal como aparece redactado, además de darle potestad a otros actores comunitarios con quienes pudiera existir algún conflicto de intereses, intrínsecamente desconoce el derecho a la información adecuada v veraz ("si no existiere capacidad para comprender") relacionada con la investigación, sus riesgos y beneficios, así como con las garantías que se deben al participante por parte del equipo de investigación y, por lo tanto, deja espacio para infringir las normas vinculadas a la autonomía, principio básico de la ética de la investigación.

# Investigación con fuentes secundarias, protección de datos personales y uso de las tecnologías de la información y la comunicación

Algunas investigaciones utilizan fuentes de datos secundarias, es decir, aquellas con información recolectada previamente para propósitos investigativos u otros. Entre estas, las más utilizadas son la historia clínica y las bases de datos. Es común que los investigadores supongan que las investigaciones en salud que utilizan fuentes secundarias no incluyen a seres humanos y que, por lo tanto, no requieren de la aprobación de los comités de ética; sin embargo, esto no es cierto y debe considerarse con todo el cuidado.

En este sentido, la Ley 23 de 1981 (33), la Resolución 13437 de 1991 (27), la Resolución 1995 de 1999 (46) y, más recientemente, la Ley 1751 de 2015 (29), establecen las condiciones en que debe administrarse, conservarse, custodiarse y mantener la confidencialidad de tal información. Por tratarse de documentos privados y sometidos a reserva, únicamente pueden conocerlos terceros con previa autorización del paciente o según los casos previstos por la ley.

Según estas normas, el uso de la historia clínica en investigaciones de salud pública, salud comunitaria y áreas afines, en aquellas de carácter retrospectivo o en investigaciones pragmáticas, plantea retos importantes para los investigadores y supone un análisis juicioso por parte de los comités de ética de investigación y los de ética hospitalaria, puesto que en algunos casos el conocimiento mismo es una necesidad o prioridad para la resolución de complejos problemas, pero su utilización sin la debida autorización puede violentar la autonomía y privacidad de los pacientes.

Las condiciones de anonimato, privacidad y confidencialidad son ampliamente reconocidas en los tratados y normas de ética nacionales e internacionales, y en este contexto en el país se expidió la ley estatutaria para la protección de datos personales sancionada mediante la Ley 1581 del 2012 (47) y reglamentada por el Decreto nacional 1377 del 2013 (48). En esta norma se reglamenta el manejo adecuado de "datos sensibles" concebidos como "los que afectan la intimidad del titular o cuyo uso indebido puede generar su discriminación, tales como aquellos que revelen el origen racial o étnico, la orientación política, las convicciones religiosas o filosóficas, la pertenencia a sindicatos, organizaciones sociales, de derechos humanos o que promueva intereses de cualquier partido político o que garanticen los derechos y garantías de partidos políticos de oposición, así como los datos relativos a la salud, a la vida sexual y los datos biométricos" (47). La norma también plantea algunas excepciones que es necesario revisar porque se corre el riesgo de excluir a algunos grupos, por ejemplo, se admite el uso de información producida por instituciones sin ánimo de lucro, lo que tácitamente estaría restringiendo la actividad de los entes privados. Por ningún motivo exceptúa la entrega de esta información a terceros. La protección de los datos personales se suma a la reglamentación sobre el acceso y el uso de los mensajes de datos por medios electrónicos reglamentados mediante la Ley 527 de 1999 que, para efectos jurídicos, cumplen la misma función que cualquier documento original siempre y cuando exista garantía confiable de que se ha conservado la integridad de la información (49).

Para proteger la confidencialidad y la privacidad de los sujetos, esta ley plantea la necesidad de solicitar al titular su consentimiento expreso para suministrar los datos personales a terceros, o que el investigador obtenga un mandato legal o judicial que le dé acceso a los datos confidenciales del sujeto; no obstante, la misma Ley y el Decreto reglamentario 1377 del 2013 (48) permiten usar esa información sin el consentimiento del titular en los siguientes casos: cuando ello obedezca a una finalidad histórica, estadística o científica; cuando se trate de urgencias médicas o sanitarias: cuando los datos se havan recolectado antes de la expedición de la norma; cuando se trate de datos de naturaleza pública; cuando dicha autorización imponga una carga desproporcionada derivada de la obligación de solicitar a cada titular la autorización para usar sus datos personales, o cuando el responsable no cuente con los datos de contacto de los titulares (48).

Las excepciones que aplican al tratamiento de estos datos, es decir las que permiten utilizar información recolectada previamente sin la debida autorización del titular, suscitan un problema ético, pues desconocen el derecho a la privacidad y niegan la autonomía de los individuos. Estos asuntos deben ser motivo de preocupación, pues es deber de quien recolecta y maneja los datos, así como del investigador, reconocer cuándo se incursiona en los estrechos límites que dividen lo público de lo privado; cuándo se trata de temas sensibles; qué implicaciones en la salud, la vida y las relaciones de los individuos, sujetos y comunidades puede ocasionar el tratamiento de datos y, asimismo, estimar cuándo y en qué condiciones la necesidad de producir conocimiento científico se impone frente al derecho a la intimidad, la seguridad y la privacidad de la gente.

Por otra parte, aunque los investigadores en salud pueden aducir razones científicas, estadísticas o sanitarias para el empleo de las bases de datos, su compromiso ético, basado en el principio de autonomía y el respeto por la privacidad, los obligaría, a ellos y a las instituciones que proveen la información, a implementar todos los mecanismos que estén a su alcance para informar a los titulares sobre el desarrollo y los objetivos de la investigación y, con ello, ofrecer a los afectados la posibilidad

Lopera MM Biomédica 2017;37:577-89

de decidir si desean que su información se utilice o no. Para ello, es válido utilizar mecanismos alternos de difusión de la información sobre el estudio en diarios, revistas, sitios de internet y mediante carteles informativos, entre otros. Además, el uso de este tipo de información obliga a que la entidad que la haya recolectado o generado la ofrezca sin revelar la identificación personal (bajo anonimato), y a que el investigador adopte las medidas conducentes a garantizar las condiciones de conservación, seguridad y privacidad durante el desarrollo de la investigación, así como en la fase de publicación o difusión de resultados. En todo caso, para dirimir cualquier conflicto ético relativo a la privacidad y confidencialidad, es necesario efectuar una rigurosa evaluación de los riesgos y beneficios que los comités de ética en la investigación deberá refrendar.

### Transferencia de datos y muestras a otros países

En el marco de la globalización, en las últimas décadas los acuerdos multilaterales sobre ciencia, así como la proliferación de investigaciones a cargo de múltiples centros y, en especial los estudios clínicos desarrollados por la industria farmacéutica internacional, han convertido la transferencia de datos y de muestras entre distintos países en una necesidad. La Ley 1581 del 2012 (47) plantea que es posible la transferencia de datos a terceros países en los casos en que con ello se pueda preservar el interés público; por ejemplo, cuando se trate del intercambio de datos de carácter médico, cuando así lo exija el tratamiento del titular, por razones de salud o higiene pública o cuando así se estipule en tratados internacionales con fundamento en el principio de reciprocidad. Esto suscita la necesidad de precisar en qué casos concretos es aplicable, puesto que la ambigüedad de la formulación puede dar pie a diferentes interpretaciones que perjudiquen los intereses nacionales o favorezcan intereses particulares, principalmente de agencias de seguros o de compañías farmacéuticas. En cualquier caso, la transferencia de datos a otros países debe cumplirse bajo las mismas condiciones de anonimato referidas por la Ley 1581 del 2012.

En cuanto a la transferencia de muestras a otros países o, incluso a otros grupos de investigación en el país, así como a su preservación en biobancos, la legislación colombiana no se ha pronunciado, excepto para definir de forma genérica la posibilidad de que los componentes anatómicos sean intercambiados con bancos y programas de trasplantes de otros países cuando el fin sea exclusivamente terapéutico y sin ánimo de lucro,

y siempre y cuando el Ministerio de Salud otorgue autorización especial y previa (50). Este es un tema de amplio interés en la esfera internacional, pues también implica la transferencia de beneficios económicos para diferentes grupos de interés y potenciales desequilibrios con relación a los beneficios de los participantes.

#### Difusión del conocimiento

En materia de publicación de los resultados, la norma colombiana plantea que la publicación de artículos debe ajustarse estrictamente a hechos científicos debidamente comprobados, y presentarse en una forma que no induzca a error (33). Este enunciado está en consonancia con los principios de integridad científica, exactitud, imparcialidad, veracidad y honestidad resaltados en las guías éticas de las ciencias biomédicas y sociales (17).

# Retos normativos para la ética de la investigación en salud

Además de las dificultades ya mencionadas, las normas colombianas tienen algunos vacíos en temas de importancia contemporánea, como la ética de la investigación en contextos de epidemia, en situaciones de emergencias y de desastres y, en general, de la investigación fisicoquímica y ambiental con repercusiones en el ecosistema, el hombre y los animales. Con relación a la investigación de epidemias, la Ley 1438 delega en el Observatorio Nacional de Salud la función de hacer el seguimiento de las condiciones de salud, no obstante, no existen normas especiales que busquen proteger a los sujetos del abuso o explotación en casos de crisis. Con relación a las normas éticas de carácter ambiental, los desarrollos son muy insignificantes y desactualizados (47). Sobre este particular, la Comisión Intersectorial de Bioética se ha manifestado con relación a la investigación ambiental y al respecto señala que la acción de los científicos debe estar comprometida con la contribución a la protección del ecosistema mediante una ética del cuidado que garantice la protección de los derechos de tercera generación y de la diversidad cultural (51). No obstante, no se han señalado criterios particulares o condiciones para su cumplimiento. Por último, la normatividad colombiana no establece los aspectos éticos concernientes a la investigación de desarrollo industrial con incidencia en problemas ambientales. Aunque el análisis de las normas ambientales excede la intención de esta revisión normativa. la ética de la investigación en salud debe concebirse desde una perspectiva holística y, por lo tanto, es necesario unificar y complementar las normas existentes en aquellos aspectos en los que haya vacíos, problemas y dilemas relacionados con los distintos entornos, en particular con el ambiental.

La normatividad colombiana se ha quedado rezagada con respecto a los nuevos desarrollos técnico-científicos y a los cambios socioculturales contemporáneos. En este sentido, es necesario actualizarla con el fin de superar, por ejemplo, la carencia de regulaciones en materia de salud pública, salud comunitaria y áreas afines, y de la salud global, la transferencia internacional de muestras biológicas, la investigación con células madre y la investigación y desarrollo relacionados con las nuevas técnicas de reproducción asistida y células embrionarias, entre otras tecnologías. El marco jurídico tampoco considera los enunciados de la Declaración de Helsinki en materia de obligaciones posteriores a la investigación (8) (conocidas en el ámbito internacional como obligaciones 'postinvestigación'), tan necesarias para garantizar que los sujetos participantes se beneficien de las intervenciones que resultaron ser eficaces, tanto en investigación básica y clínica como en salud pública. Estos aspectos constituyen importantes campos de análisis para bioeticistas, salubristas y profesionales de las ciencias sociales, humanas y ambientales.

# Algunas reflexiones y conclusiones

Las reflexiones sobre la ética de la investigación y las normas que la sustentan como expresión de la política y los valores de una sociedad implican reconocer la heterogeneidad del tipo de investigación en salud (básica, clínica y de salud pública, salud comunitaria y áreas afines), así como los múltiples objetos de investigación factibles. Ello implica la definición de las condiciones particulares y las formas en las que debe desarrollarse cada tipo de investigación.

Son muchos los factores que deben abordarse en este contexto, pero los principales son la idoneidad y los principios morales de los investigadores, así como la celeridad de la autoridad sanitaria para expedir las normas necesarias que protejan a los sujetos y a los grupos sociales a los que pertenecen, así como su entorno ecológico. Para ello, es preciso basarse en un concepto amplio de salud y de los factores que la determinan, instaurar una reflexión profunda de los desarrollos de la ética de la investigación a nivel conceptual sobre los objetos de la investigación en salud y sus implicaciones y a nivel empírico sobre el quehacer y los procedimientos investigativos, para articular una política integral que oriente la praxis en este campo.

Todos los involucrados en la investigación deben ejercer su labor investigativa de manera que se promueva y garantice el respeto, la dignidad, la autonomía y la seguridad de los sujetos participantes; que prevea, prevenga y mitigue los riesgos derivados de la investigación, y que contemple los beneficios individuales y sociales durante la investigación e incluso después de ella.

#### Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el marco de la beca otorgada por el Centro Internacional Fogarty de los *National Institutes of Health* de Estados Unidos (NHS) y con el apoyo de la Universidad de Antioquia.

#### Conflicto de intereses

Ninguno.

#### **Financiación**

Estrategia de sostenibilidad del Comité para el Desarrolo de la Investigación (CODI) de la universidad de Antioquia.

#### Referencias

- Congreso de Colombia. Constitución Política de Colombia. Gaceta Constitucional No. 116. Bogotá: Congreso de Colombia; 1991.
- Luna F. Vulnerabilidad: la metáfora de las capas. Jurisprudencia Argentina. 2008;4:1-13.
- Del Percio D. La investigación clínica en contextos sociales de pobreza. De vulnerabilidades y autonomías. Reflexiones Latinoamericanas de Bioética. México, D.F: Publidisa Mexicana S.A. de C.V; 2014. p. 43-65.
- Ministerio de Relaciones Exteriores. Colombia frente a los instrumentos internacionales en materia de derechos humanos y derecho internacional humanitario. Bogotá D.C.: Cancillería Colombiana; 1948. p. 1-27.
- Naciones Unidas. Declaración Universal de Derechos Humanos. 1948 Fecha de consulta: 14 de enero de 2016. Disponible en: http://www.un.org/es/documents/udhr/
- Organización de Nacionaes Unidas. Declaración de los derechos del Niño. Asamblea General de las Naciones Unidas. New York: UNICEF; 1959. p. 1-3.
- British Medical Journal. The Nuremberg Code (1947). BMJ. 1996;313:1448. https://doi.org/10.1136/bmj.313.7070.1448
- Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki de la AMM. Principios éticos para las investigciones médicas en seres humanos. Adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial. Finlandia: World Medical Association; 2013. p. 1-9.
- National Commission for the Protection of Human Subjects of Biomedical and Behavioral Research. The Belmont report. Ethical principles and Guidelines for the protection of human subjects of researc. Washington: Department of Health, Education, and Welfare; 1979. p. 1-10.

Lopera MM Biomédica 2017;37:577-89

- 10. Council for International Organizations of Medical Sciences, Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud. Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos. Ginebra: Council for International Organizations of Medical Sciences; 2002.
- 11. Council for International Organizations of Medical Sciences, World Health Organization. International Ethical Guidelines for Health-related Research Involving Humans. Geneva, 2016. Fecha de consulta: 4 de julio de 2017. Disponible en: https://cioms.ch/wp-content/ uploads/2017/01/WEB-CIOMS-EthicalGuidelines.pdf
- Council for International Organizations of Medical Sciences, World Health Organization. International Ethical Guidelines for Epidemiological Studies. Ginebra: Council for International Organizations of Medical Sciences; 2008. p. 1-113.
- 13. United Nations Educational Scientific and Cultural Organization. Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos. París: Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura; 2005. Fecha de consulta: 14 de enero de 2016. Disponible en: http://portal.unesco.org/es/ev.php-URL\_ID=31058&URL\_DO=DO\_TOPIC&URL\_SECTION=201.html
- Organización Mundial de la Salud. Guías operacionales para comités de ética que evalúan investigación biomédica. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2000. p. 1-31.
- 15. European Forum for Good Clinical Practice. Directrices y recomendaciones para las comisiones éticas europeas – 2004. Fecha de consulta: 9 de octubre de 2015. Disponible en: http://www.bioeticaweb.com/directrices-y-recomendaciones-para-las-comisiones-aticas-europeas-del-2/
- 16. International Council for Harmonisation for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Integrated addendum to ICH E6 (R1): Guideline for good clinical practice E6 (R2). Current Step, 4. November 2016. Fecha de consulta: 6 de diciembre de 2017. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public\_Web\_Site/ICH\_Products/Guidelines/Efficacy/E6/E6\_R2\_Step\_4\_2016\_1109.pdf
- 17. American Psychological Association. Ethical principles of psychologist and code of conduct. Washington, D.C.: American Psychological Association; 2010. Fecha de consulta: 12 de enero de 2016; Disponible en: http://www.apa.org/ethics/code/
- American Sociological Association. Code of Ethics and Policies and Procedures. Washington, D.C.: ASA Committee on Professional Ethics; 1999.
- Council of Europe. Additional Protocol to the Convention for the Protection of Human Rights and Dignity of the Human Being with regard to the Application of Biology and Medicine, on the Prohibition of Cloning Human Beings. Treaty No.168. París: Council of Europe – 2001. Fecha de consulta: 3 de marzo de 2016. Disponible en: http://www.coe.int/es/web/ conventions/full-list/-/conventions/treaty/168
- United Nations Educational Scientific and Cultural Organization. Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos. París: UNESCO; 1997. p. 1-14.

 United Nations Educational Scientific and Cultural Organization. Declaración sobre la ciencia y el uso del saber científico. Budapest: UNESCO; 1999. p. 1-53.

- 22. United Nations Educational Scientific and Cultural Organization. Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos. París: UNESCO; 2003. p. 1-50.
- World Psychiatric Association. Declaración de Madrid sobre los Requisitos Éticos de la Práctica de la Psiquiatría. Yokohama: WPA; 2002. p. 1-7.
- 24. Organización de las Naciones Unidas. Declaración de las Naciones Unidas sobre los Derechos de los Pueblos Indígenas. Resolución aprobada por la Asamblea General. Ginebra: Naciones Unidas; 2007. p. 1-19.
- World Medical Assembly. Declaration of venice on terminal illness. Pilanesberg: WMA; 2006. Fecha de consulta: 24 de enero de 2016. Disponible en: http://www.wma.net/policiespost/wma-declaration-of-venice-on-terminal-illness/
- 26. **Ministerio de Salud.** Resolución № 008430. Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Bogotá: Ministerio de Salud; 1993. p. 1-12.
- 27. Ministerio de Salud. Resolución 13437. Por la cual se constituyen los comités de Ética Hospitalaria y se adopta el Decálogo de los Derechos de los Pacientes. Bogotá: Ministerio de Salud; 1991. p. 1-2.
- Congreso de Colombia. Ley 1164. Por la cual se dictan disposiciones en materia del talento humano en salud. Bogotá: Diario Oficial No. 46.771; 2007. p. 1-29.
- Congreso de Colombia. Ley 1751. Por medio de la cual se regula el derecho fundamental a la salud y se dictan otras disposiciones. Bogotá D.C: Diario Oficial 49427; 2015.
- Florencia L, Arleen S. Relación Médico Paciente. Bioética: Nuevas reflexiones sobre debates clásicos. Buenos Aires: Editorial Sudamericana; 2008. p. 41-89.
- Muhle M. Sobre la vitalidad del poder. Una genealogía de la biopolítica a partir de Foucault y Canguilhem. Revista de Ciencia Política. 2009;29:143-63.
- Foucault M. Nacimiento de la biopolítica. Buenos Aires: Fondo de Cultura Económica de Argentina, S.A; 2007. p. 1-202
- Congreso de Colombia. Ley 23. Por la cual se dictan Normas en Materia de Ética Médica. Diario Oficial No. 35.711. Bogotá: Congreso de Colombia; 1981. p. 1-22.
- 34. Ministerio de la Protección Social. Resolucion N°2378. Por la cual se adoptan las Buenas Prácticas Clínicas para las instituciones que conducen investigación con medicamentos en seres humanos. Bogotá: Ministerio de la Protección Social; 2008. p. 1-93.
- 35. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Instituciones certificadas en Buenas Prácticas Clínicas. Bogotá, D.C.: INVIMA; 2015. Fecha de consulta: 8 de octubre de 2015. Disponible en: www.invima.gov. co/images/pdf/inspecion\_y\_vigilancia/buenas-practicasclinicas
- 36. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Resolución 20764. Por la cual se establece el reglamento relativo al contenido y periodicidad de los reportes de eventos adversos en la fase de investigación

- clínica con medicamentos en humanos de que trata el artículo 146 del Decreto 677 de 1995. Diario Oficial No. 48.109. Bogotá, D.C:INVIMA; 2011. p. 1-4.
- 37. Ministerio de Salud. Decreto 677. Por el cual se reglamenta parcialmente el Régimen de Registros y Licencias, el Control de Calidad, así como el Régimen de Vigilancia Sanitaria de Medicamentos, Cosméticos, Preparaciones Farmacéuticas a base de Recursos Naturales, Productos de Aseo, Higiene y Limpieza y otros productos de uso doméstico y se dictan otras disposiciones sobre la materia. Santafé de Bogotá: Ministerio de Salud; 1995. p. 1-67.
- Ministerio de Salud y Protección Social. Decreto 1505.
   Por el cual se modifica el Decreto 677 de 1995. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 2014. p. 1-3.
- 39. Ministro de Gobierno de la República de Colombia. Decreto 1290. Por el cual se precisan las funciones del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos -INVIMA y se establece su organización básica. Diario Oficial No. 41.406; Bogotá, D.C: Ministro de Gobierno; 1994. p. 1-12.
- 40. Congreso de Colombia. Ley 84. Por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia. Diario Oficial 39120. Bogotá: Congreso de Colombia;1989. p. 1-15.
- Cambon-Thomsen A. The social and ethical issues of postgenomic human biobanks. Nat Rev Genet. 2004;5:866-73. https://doi.org/10.1038/nrg1473
- Veloza LA, Wiesner C, Serrano M, Peñaranda N, Huertas A. Consideraciones éticas y legales de los biobancos para investigación. Bioética. 2010;5:121-41.
- Lacadena JR. ¿Un paso adelante hacia la clonacón humana con fines terapeúticos? An Real Acad Farm. 2013;79:241-52.
- Singer P. De compras por el supermercado genético. Isegoría. 2002;27:19-40.

- 45. Sirpa S, Dolores I, Violetta A, Ségolene A, Suzanne B, Martina C, et al. The interface between assited reproductive technologies and genetics: Technical, social, ethical and legal issues. Eur J Hum Genet. 2006;14:588-645. https:// doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201598
- Ministerio de Salud. Resolución 1995. Por la cual se establecen normas para el manejo de la Historia Clínica. Bogotá, D.C: Ministerio de Salud; 1999. p. 1-9.
- 47. Congreso de Colombia. Ley estatutaria 1581. Por la cual se dictan disposiciones generales para la protección de datos personales. Diario Oficial No. 48.587. Bogotá, D. C: Congreso de Colombia; 2012.
- 48. Ministerio de Comercio, Industria y Turismo. Decreto 1377. Por el cual se reglamenta parcialmente la Ley 1581 de 2012. Diario Oficial 48834. Bogotá, D.C: Ministerio de Comercio Industria y Turismo; 2013. p. 1-11.
- 49. Congreso de Colombia. Ley 527. Por medio de la cual se define y reglamenta el acceso y uso de los mensajes de datos, del comercio electrónico y de las firmas digitales, y se establecen las entidades de certificación y se dictan otras disposiciones. Diario Oficial 43.673. Santafé de Bogotá: Congreso de Colombia; 1990. p. 1-2.
- 50. Presidencia de la República de Colombia. Decreto 1546. Por el cual se reglamentan parcialmente las Leyes 9a de 1979 y 73 de 1988, en cuanto a la obtención, donación, preservación, almacenamiento, transporte, destino y disposición final de componentenes anatómicos y los procedimientos para trasplante de los mismos en seres humanos y se adoptan las condiciones mímimas para el funcionamiento de las Unidades de Biomedicina reproductiva, centros o similares. Diario Oficial 43357. Santafé de Bogotá D.C.; Presidencia de la República: 1998.
- Copello A. Recomendaciones de la Comisión Intersectorial. Revista La Tadeo. 2002;67:121-8

#### REVISIÓN DE TEMA

# El análisis de orina como herramienta diagnóstica en casos de malaria grave

Sebastián Barrera<sup>1,2</sup>, Alberto Tobón-Castaño<sup>2</sup>

- <sup>1</sup> Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
- <sup>2</sup> Grupo de Malaria, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

La malaria produce complicaciones y muerte especialmente en poblaciones con acceso limitado a la atención en salud. La malaria grave puede reconocerse tempranamente mediante la detección en la orina de hallazgos como la hematuria, la coluria y la proteinuria.

Se hizo una revisión narrativa basada en estudios sobre malaria grave y el empleo del análisis de orina mediante la consulta de 91 publicaciones.

Mediante el análisis de la orina, se pueden detectar alteraciones metabólicas y lesiones en distintos órganos. En estudios recientes en Colombia se ha confirmado su utilidad como apoyo en el diagnóstico de la disfunción renal, la disfunción hepática y la anemia asociada con hemólisis, las cuales son complicaciones frecuentes en la malaria.

El examen constituye una herramienta de fácil aplicación en la consulta ambulatoria y en pacientes hospitalizados para reconocer tempranamente casos complicados, y permite la detección oportuna de diferentes lesiones en el paciente con malaria, contribuyendo así a la reducción de la morbilidad grave y la mortalidad.

**Palabras clave:** malaria, proteinuria, hematuria. doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3416

#### Urinalysis as a diagnostic tool in severe malaria

Malaria accounts for a significant morbidity and mortality rate around the world, especially in communities with limited access to healthcare. Some clinical signs in urine, like haematuria, coluria and proteinuria, help for the early diagnosis of severe malaria cases.

A narrative review was conducted by analyzing 91 publications on studies about severe malaria cases and the use of urinalysis.

A urinalysis can detect metabolic disturbances and organ injury. Its diagnostic utility for frequent complications caused by malaria, such as hepatic injury, kidney dysfunction and hemolysis, has been confirmed by recent Colombian studies.

This test is an easy-to-use tool in outpatient clinics and with hospitalized patients to promptly recognize complicated cases, allowing the timely identification of different lesions in patients with malaria, thus contributing to the reduction of severe morbidity and mortality.

**Key words:** Malaria, proteinuria, haematuria. doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3416

La malaria es una enfermedad que afecta principalmente a las comunidades que habitan en regiones tropicales en donde constituye un importante problema de salud pública; las poblaciones afectadas tienen, en general, un acceso limitado a la atención en salud y a los recursos diagnósticos.

Correspondencia:

Alberto Tobón-Castaño, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Calle 53 N° 61-30, Medellín, Colombia Teléfono: (574) 219 6486; Pbx: (574) 219 6487

alberto.tobon1@udea.edu.co

Recibido: 15/07/16; aceptado: 26/02/17

En 2015 se informó una incidencia de 214 millones de casos clínicos y 438.000 muertes, la mayoría en el África subsahariana (1). La malaria afecta de manera importante a los niños, grupo que representó el 16 % del total de casos en 2015 (2) y se consideró la causa de 7 % de las muertes

### Contribución de los autores:

Sebastián Barrera: búsqueda bibliográfica y escritura del manuscrito Alberto Tobón: búsqueda bibliográfica, revisión crítica, corrección y escritura del manuscrito Los dos autores participaron en la escritura del manuscrito.

en menores de 5 años en el 2014 (3). Aunque en América Latina el riesgo de adquirir la enfermedad es bajo (4), Colombia representa un caso particular, ya que el 85 % de su área rural presenta condiciones climáticas y geográficas aptas para la transmisión de la enfermedad (5), donde los principales agentes etiológicos causantes de infección única son *Plasmodium vivax* (46,6 %) y *P. falciparum* (51,8 %) (6).

Las complicaciones clínicas en la malaria varían en función del grupo etario, siendo más comunes alteraciones como la hipoglucemia, las convulsiones, la anemia grave y la acidosis en niños, mientras que el edema pulmonar y el daño renal son más comunes en pacientes adultos (4,7,8). Según la guía de tratamiento de la malaria del 2015 de la Organización Mundial de la Salud, la parasitemia causada por *Plasmodium* spp que se acompaña de alteraciones clínicas o de laboratorio inexplicables por otras causas, constituye un cuadro de malaria complicada. Entre estas alteraciones se incluyen el coma o más de dos convulsiones en 24 horas, el síndrome de dificultad respiratoria aguda, el edema pulmonar, la hipotensión grave (presión arterial sistólica <70 mm Hg en adultos o <50 mm Hg en niños), la lesión renal aguda (creatinina sérica >3 mg/dl o nitrógeno ureico en sangre -BUN>60 mg%), la ictericia sumada a las lesiones de órgano, la hipoglucemia (glucemia <40 mg%), la anemia grave (hemoglobina <5 g/dl), la hiperlactatemia y la acidosis metabólica (9).

Aunque *P. falciparum* se ha considerado el principal causante de malaria grave, *P. vivax* también ha demostrado la capacidad de producir complicaciones clínicas (10), y cada vez son más frecuentes los reportes en este sentido provenientes de regiones de baja endemia donde este parásito circula, como en el caso de Colombia (1). Ello hace necesario reconocer tempranamente las manifestaciones de deterioro clínico o los signos de peligro de desarrollar la enfermedad en su forma complicada (11), independientemente de la especie de plasmodio presente.

El análisis de la orina (tambien llamado uroanálisis, examén parcial de orina o examén citoquímico de orina) permite evidenciar signos de daño poco explorados en los pacientes con malaria. Este examen, que tiene un bajo costo y puede realizarse en la consulta ambulatoria o en el paciente hospitalizado, brinda valiosa información sobre su estado clínico.

El objetivo de esta revisión fue describir hallazgos comprobados mediante el análisis de orina en pacientes con malaria y su correlación con las lesiones de órganos, así como analizar su utilidad en el diagnóstico de complicaciones en la malaria.

#### Materiales y métodos

Se realizó una revisión narrativa mediante la búsqueda bibliográfica en la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos de América, "Pubmed", sin restricción de fechas de publicación o idioma, entre enero y marzo de 2016. La búsqueda se hizo en tres categorías: 1) estudios sobre el uso del análisis de orina en pacientes con malaria usando la combinación de términos Mesh "urinalysis and (Plasmodium or malaria or paludism)"; 2) estudios sobre orina oscura por tratarse del signo más informado en pacientes con malaria en el análisis de orina, con la combinación de términos Mesh "dark urine and (Plasmodium or malaria or paludism)"; 3) estudios sobre malaria complicada que hubieran estudiado alteraciones en la orina usando la combinación de términos Mesh "complicated malaria and (clinical or renal or hepatic or anemia)".

#### Criterios de inclusión

Se analizaron todos los artículos de estudios de casos y controles, cohortes y estudios transversales encontrados en las categorías 1 y 2; en la 3 se seleccionaron los documentos relevantes según pertinencia temática dada la abundancia de artículos que incluían el término "orina".

### Resultados

En la categoría 1 se encontraron 27 publicaciones de la cuales se analizaron cuatro; en la 2 se encontraron 19 y se analizaron cuatro, y en la 3 se hallaron 268 publicaciones y se seleccionaron 83.

#### Hallazgos de la revisión

Complicaciones frecuentes en la malaria y signos de peligro. Los signos y síntomas en los pacientes con malaria no complicada por lo general hacen parte de un síndrome febril agudo acompañado de escalofrío, sudoración, cefalea, dolor osteomuscular y vómito. A medida que se agrava el cuadro clínico, aparecen signos y síntomas que señalan la instauración de la enfermedad complicada (12); entre los signos de peligro más frecuentemente observados se incluyen ictericia, palidez, signos respiratorios, orina oscura, alteraciones neurológicas, postración, hiperpirexia y vómito repetido (13-16). En Colombia, la disfunción hepática (12-33 %), la disfunción renal (3-31 %) y la anemia grave (5-12 %) (12,17) son los criterios de malaria grave más frecuentemente informados.

Barrera S, Tobón-Castaño A Biomédica 2017;37:590-9

Las complicaciones hepáticas se han descrito en los casos de malaria causados por todas las especies en humanos (18,19), generalmente asociadas con la ictericia, la cual se observa en las escleróticas cuando la bilirrubina supera los 3 mg/dl (20), y puede obedecer también a la hemólisis (21). La ictericia se considera una de las manifestaciones clínicas de complicación más comunes en pacientes con malaria por P. falciparum (10-40 %) (8) y alcanza una frecuencia de hasta 9 % en la causada por P. vivax. La ictericia se asocia con las lesiones hepática y renal (20,22,23), y fue mas frecuente en quienes presentaban lesión renal que en quienes no tenían esta complicación (24-27); por ejemplo, en Vietnam se observó que la frecuencia de ictericia fue de 63 % en pacientes con malaria y falla renal frente a 20 % en aquellos sin compromiso renal (28).

La anemia grave en la malaria se explica, en parte, por la hemólisis y se presenta con mayor frecuencia en niños (29-32), en quienes un signo frecuente es la palidez intensa, llamada también palidez definitiva; este signo se hace evidente cuando los niveles de hemoglobina descienden por debajo de 7 u 8 g/dl (33), lo cual se ha establecido como un signo de gran especificidad para diagnosticar la anemia grave (34).

La lesión renal aguda en los pacientes con malaria ha resultado en una alta tasa de mortalidad (35,36), y se ha relacionado con otras complicaciones clínicas (37-39), tales como la malaria cerebral (40), la hiperbilirrubinemia (41,42) y la coagulación intravascular diseminada (43,44), todos factores de mal pronóstico. La lesión renal informada con mayor frecuencia en la malaria es de tipo agudo. En general, se ha descrito la necrosis tubular (45), así como la enfermedad renal crónica (44,45). La glomerulonefritis, atribuida a reacciones mediadas por complejos inmunes y proteínas del complemento, también se ha descrito, pero con menor frecuencia. Aunque hay relación entre la lesión renal aguda y la enfermedad renal crónica (46), en la malaria esto no se conoce. Algunos signos como la orina oscura, la proteinuria y la hematuria se han descrito en casos de lesión renal en la malaria (47-50).

El síndrome nefrótico en la enfermedad crónica puede presentarse con mayor frecuencia en niños, especialmente asociada con infecciones por *P. malariae*, siendo la proteinuria un hallazgo característico (48). La orina oscura se ha explicado por la hemoglobinuria (51), la mioglobinuria (51), la

hematuria (33) y la bilirrubinuria (33,52); la oportuna detección de esta alteración en la orina ayudaría a reconocer tempranamente las lesiones hepática y renal (31). Sin embargo, como signo de peligro se ha explorado poco en el paciente con malaria, al igual que otras alteraciones detectadas en el análisis de orina. Debe tenerse presente que la lesión renal aguda en los pacientes con malaria se ha relacionado con la presencia de lesión en otros órganos y con un peor pronóstico (15,53-55).

#### Análisis de orina

El término análisis de orina hace referencia a un conjunto de pruebas de tamización que permiten detectar la enfermedad renal, las afecciones de las vías urinarias o las sistémicas (56). El uso de las tiras reactivas permite evaluar componentes fisicoquímicos y celulares de la orina (57). Los parámetros estudiados en la orina mediante el análisis de orina se presentan en el cuadro 1.

#### Alteraciones en el análisis de orina en la malaria

Los estudios que evaluaban las alteraciones en el análisis de orina en la malaria fueron escasos. Se han descrito la proteinuria (33,50,60), la hematuria (50,60,61), la mioglobinuria (22,41,51), la urobilinuria (52) y la hemoglobinuria (62), alteraciones que están relacionadas con las complicaciones y que pueden utilizarse como marcadores tempranos del daño.

En un estudio realizado en Sudán en el cual se evaluaron las alteraciones detectadas en el análisis de orina de 600 pacientes con malaria por *P. falciparum* se reportó albuminuria (84,9 %), cilindros (71,4 %), piuria (53,8 %) y hematuria (45 %) (63). La comparación de los parámetros del análisis de orina de pacientes febriles con malaria causada por diferentes especies de *Plasmodium* y de otros sin malaria en Nigeria evidenció una mayor frecuencia de alteraciones en aquellos con bilirrubinuria y urobilinuria en 30 y 10 % de los casos de malaria, respectivamente, frente a 15 y 5 % de los controles (p< 0,05) (52).

El análisis de orina en casos graves y agudos de malaria por *P. falciparum* o *P. vivax* en dos regiones de Colombia mostró que 22 % de los pacientes presentaba orina oscura, alteración que se asoció con la disfunción hepática, la disfunción renal y la anemia grave. Además, en estos pacientes se presentó hemoglobinuria (86 %), urobilinuria (66 %), proteinuria (54 %), hematuria (43 %) y bilirrubinuria (39 %); la proteinuria se asoció con la disfunción renal (33). Una forma poco frecuente de

Cuadro 1. Parámetros que incluye el análisis de orina\*

Característica	Condición normal	Causas de anormalidad
Aspecto	Transparente	Si hay espuma abundante o persistente se asocia a proteinuria o a la presencia de sales biliares que modifican la tensión superficial. El aspecto turbio de la orina puede deberse a piuria, infecciones bacterianas o fúngicas.
Color	Ámbar	Presencia de urocromos que no siempre representa un hallazgo patológico, ya que puede deberse a alimentos o interacción con medicamentos.
Ph	Oscila a lo largo del día entre 4,6-8,0	Afectado por la dieta: proteínas y componentes ácidos lo acidifican mientras que dietas ricas en citrato lo alcalinizan. Los valores extremos, altos o bajos, pueden deberse a presencia de leucocitos o eritrocitos.
Gravedad específica	Rango de normalidad para las tirillas de orina: 1.016-1.022 (56)	Valores de 1.020 o más se relacionan con pérdidas de agua corporal a partir de 4 % e indican deshidratación; valores inferiores a 1.010 se han relacionado con estados de adecuada hidratación (58) o con alteración el los mecanismos de concentración tubular o tubular e intersticial.
Proteínas	Ausente (<10 mg/dl)	La excreción diaria entre 30 y 150 mg se define como microalbuminuria y es un signo de enfermedad renal temprana.
Glucosa	Ausente (<30 mg/dl)	Hay glucosuria si la carga de glucosa filtrada supera la reabsorción renal (180 mg/dl); se asocia a diabetes mellitus, enfermedades del páncreas, enfermedades hepáticas y síndrome de Fanconi.
Urobilinógeno	Ausente; puede estar en pequeñas cantidades (<1 mg/dl)	Su presencia puede ser un indicador temprano del daño del parénquima hepático, enfermedad hepatocelular y anemia hemolítica.
Bilirrubina	Ausente; puede encontrarse en valores bajos (< 0,2 mg/dl)	Su presencia se denomina coluria. La bilirrubina conjugada es soluble en agua, por tanto los resultados positivos en la tirilla reactiva se deben a esta bilirrubina y pueden observarse en pacientes con ictericia obstructiva, daño hepático y cáncer de páncreas o de conductos biliares. La bilirrubina no conjugada, resultado de los diferentes procesos hemolíticos, es insoluble en agua, no puede pasar a través del glomérulo renal y no se ve representada en la tirilla reactiva.
Nitritos	Ausentes	Son producto de la reducción bacteriana de nitratos urinarios a nitritos; la mayoría de bacterias Gram positivas y Gram negativas pueden realizar esta conversión, por lo que un resultado positivo en este parámetro es específico para bacteriuria.
Leucocitos	Normalmente no aparecen en orina	Los leucocitos excretados en la orina son casi exclusivamente polimorfonucleares, neutrófilos y eosinófilos; la tirilla reactiva los detecta por la actividad de la esterasa que poseen y detecta tanto leucocitos lisados como íntegros.
Sangre	Ausente	La tirilla reactiva detecta eritrocitos completos, eritrocitos lisados y hemoglobina por la actividad peroxidasa de los eritrocitos, reacción que también puede ser catalizada por la mioglobina, por lo tanto un resultado positivo puede indicar cualquiera de estos componentes biológicos. La prueba permite diagnosticar hematuria o hemoglobinuria y hemoglobina libre (59).

<sup>\*</sup>Tabla elaborada con base en los estudios de Campuzano y de Arbeláez (56,57)

alteración en la orina se presenta en el síndrome llamado "fiebre de aguas negras" (black water fever), el cual se ha informado especialmente en infecciones con P. falciparum, pero también con P. vivax y P. malariae, y en sujetos con deficiencia de glucosa-6 fosfato deshidrogenasa está asociado con el uso de antimaláricos del grupo de los aminoalcoholes, como la quinina y la halofantrina (64).

Es una forma grave de la malaria debida a la hemólisis intravascular masiva, la cual se manifiesta con hemoglobinuria, anemia, ictericia y orina oscura (color negro) (65) y a menudo produce lesión renal (64).

Proteinuria. Esta alteración se ha reportado en pacientes de Nigeria y Colombia (50,52,66); en pacientes colombianos se informó 54 % de proteinuria en un estudio que incluyó casos graves y controles, la cual se asoció con disfunción renal (OR=2,5; 1,0-6,5) (33). En los pacientes con lesión renal aguda la proteinuria es indicativa de la progresión hacia nefropatía (33,37,42,67), y se ha reportado que esta alteración en presencia de hematuria es sugestiva de enfermedad glomerular (50,68). Se ha establecido que la proteinuria en la malaria presenta un patrón glomerular intersticial (67,69), lo cual podría explicarse por el daño

Barrera S, Tobón-Castaño A Biomédica 2017;37:590-9

generado por el infiltrado linfocitario y por el depósito de complejos inmunitarios, aunque esto último se ha reportado poco (48,70).

En un estudio sobre la capacidad del análisis de orina para detectar el daño renal en pacientes con malaria se concluye que la proteinuria es un factor independiente de daño renal, con una sensibilidad de 88,2 % y una especificidad de 62,7 % (60). Sin embargo, la proteinuria no se relacionó con el nitrógeno ureico en sangre, lo cual probablemente se explica por el estado hipercatabólico asociado con el desarrollo de la lesión renal aguda que se ha descrito en casos de malaria (47,71).

Por otra parte, en un estudio en el que participaron 1.328 pacientes colombianos entre 5 y 65 años de edad, se reportó la relación entre la proteinuria y un nivel de creatinina mayor de 1,5 mg/dl, coluria y hemoglobinuria, lo que sugiere su papel como marcador de disfunción renal (50).

En Nigeria se evaluó el comportamiento de la función renal en niños durante el ataque agudo de malaria, y se encontró que la proteinuria se presentó en 40 % de los pacientes en la fase aguda de la infección. Aunque no se relacionó con una reducción en la tasa de depuración de la creatinina, la cual fue más baja durante la infección aguda comparada con la fase de recuperación, los autores concluyeron que se daba un deterioro de la función renal durante la fase aguda de la infección en niños (66).

Debe tenerse presente que la creatinina por sí sola no es el mejor indicador de lesión renal, y que se cuestiona la utilidad de la clasificación de la lesión renal aguda basada en los valores de creatinina debido a su falta de sensibilidad y especificidad (72), además de su tardía elevación en los episodios de daño renal, llegando a niveles clínicamente significativos una vez la tasa de filtración glomerular ha caído en 50 % (73). En este sentido, Hanson, et al., no encontraron relación entre la concentración de creatinina en san-gre y la mortalidad en pacientes con malaria, pero sí evidenciaron mayores valores de nitrógeno ureico en sangre entre los pacientes que murieron (74).

En conclusión, la proteinuria en los pacientes con malaria es un hallazgo que puede indicar tempranamente la progresión de la infección hacia nefropatía. Esta observación es de vital importancia si se tiene en cuenta que la falla renal aguda es una de la principales causas de mortalidad en los pacientes con procesos infecciosos graves

(75,76) y que su lesión durante la sepsis, generada por una serie de factores como la hipovolemia y la hipotensión, es un fenómeno común (77) y potencialmente reversible (49).

Bilirrubinuria. Al final del ciclo eritrocítico de la infección por *Plasmodium* spp se genera la ruptura de los eritrocitos con esquizontes, hecho que se relaciona con los paroxismos febriles propios de la enfermedad (78). Sin embargo, la hiperbilirrubinemia que se produce es generalmente leve, y no causa ictericia intensa (23,79), posiblemente porque la proporción de eritrocitos infectados suele ser baja y la parasitemia por sí sola solo explica hasta 10 % de la disminución total del hematocrito (80).

La bilirrubinemia a expensas de la bilirrubina directa se puede explicar en el paciente con malaria por la colestasis; al parecer la ictericia de origen hepatocelular parece deberse a la supresión de la excreción de la bilirrubina (21). La bilirrubinemia que se produce por la hemólisis se da a expensas de la bilirrubina indirecta, la cual no se detecta en el análisis de orina; pero este, en cambio, detecta la bilirrubina directa (conjugada) debido a que esta sí atraviesa la barrera de filtración glomerular (56).

En los pacientes con malaria se ha reportado el incremento de la bilirrubina total y directa (20,22,33,52,81), posiblemente debido a la conjugación hepática (33). Esta hiperbilirrubinemia, conjuntamente con el incremento de las transaminasas, es un marcador importante de la disfunción hepática (33,82). Ante un aumento de la bilirrubina directa, la respuesta fisiológica está orientada a incrementar su excreción (83). Se ha descrito que la bilirrubina directa puede ser tóxica para las células del epitelio tubular renal, con el paulatino deterioro de la función del órgano que favorece la acumulación de bilirrubina en sangre, lo cual perpetúa el ciclo de daño (84).

La bilirrubinuria, o coluria, se explica entonces por la bilirrubina directa y se ha reportado en 14 a 28 % de los pacientes con malaria (13,33,52), y se la ha asociado con la presencia de orina oscura (33); asimismo se ha correlacionado positivamente con la parasitemia (85).

Hematuria, hemoglobinuria y mioglobinuria. Desde el punto de vista clínico, la hematuria puede presentarse por alguna de estas causas: daño glomerular, daño renal no glomerular o por sangrado en zonas de las vías urinarias diferentes al riñón (hematuria urológica). El daño glomerular se manifiesta con la presencia de proteinuria

significativa y eritrocitos dismórficos; en el daño renal no glomerular se presenta la proteinuria no asociada con eritrocitos dismórficos o cilindros eritrocitarios, y la hematuria urológica no se asocia con eritrocitos dismórficos, cilindros eritrocitarios o proteinuria significativa (57). El sedimento, además de indicar el origen de la hematuria, también es útil para saber si hay presencia de necrosis tubular renal (86), que es el hallazgo histológico más común en la lesión renal en el paciente con malaria (38,39,45).

La presencia de hemoglobinuria se ha relacionado con el daño renal en la malaria (51,61,62); la presencia de sangre en el análisis de orina (en cualquiera de las formas detectadas por la tirilla reactiva), se ha reportado entre 15 y 44 % de los pacientes con malaria (50,52,87). Se ha reportado que los valores de hematuria son más altos en pacientes con lesión renal; en la India la presencia de hematuria registró una sensibilidad de 94,1 % y una especificidad de 90,8 % para la detección de la lesión renal aguda, además de tener una relación estadística con niveles más elevados de nitrógeno ureico en sangre y de creatinina (60).

La frecuencia informada de hematuria en diferentes estudios no guarda relación con la especie de *Plasmodium*. En Nigeria se encontró que la frecuencia de hematuria fue significativamente mayor en pacientes con infección por *P. falciparum* comparada con otras especies (52). En la India, 8,3 % de pacientes infectados con *P. falciparum* y el 8,2 % con *P. vivax* presentaron hemoglobinuria (88), mientras que en pacientes colombianos la hemoglobinuria fue mayor con *P. vivax* (19,6 %) que con *P. falciparum* (1,9 %) (50). Esta variabilidad puede deberse a que se suman los datos de pacientes con malaria grave y sin ella y no se excluyen las comorbilidades que pudieran explicar las diferencias.

La hemoglobinuria y mioglobinuria se pueden presentar en condiciones como las anemias hemolíticas graves y las lesiones musculares (34), condiciones que pueden ocurrir en el paciente con malaria. La mioglobinuria se ha reportado como causante de la orina oscura (51,89,90) y la lesión renal en la malaria (91-96). La rabdomiolisis es una condición poco informada en la malaria; se ha descrito tanto en la infección con *P. vivax* como en la causada por *P. falciparum* (90,97) y poco se sabe de su patogenia. Sin embargo, se especula que la obstrucción microcapilar podría tener un papel muy importante (98).

Urobilinógeno. La presencia de urobilinógeno en la tirilla reactiva indica la presencia de una lesión en el parénquima hepático (56), y se lo ha relacionado con alteraciones en los marcadores de la función hepática. Aunque este parámetro del análisis de orina no ofrece mayor información que la que aportaría un cuadro clínico sugestivo de lesión hepática (99), sí puede ser muy útil cuando esta no está presente. La orina alcalina aumenta la depuración del urobilinógeno, y ello puede ser la causa del resultado de falso positivo (56).

En la malaria se ha reportado una incidencia de urobilinuria de hasta 41 % (33,52), lo cual se ha relacionado con la orina oscura (33).

Leucocituria. La leucocituria es muy específica de la infección en las vías urinaria, sin embargo, presenta poca sensibilidad; su presencia concomitante con la de nitritos es un indicador de infección. A pesar de esto, los nitritos pueden dar resultados negativos por múltiples razones, entre ellas, que la bacteria carezca de la enzima que cataliza la conversión de nitratos a nitritos (57). En un estudio en Nigeria, la piuria se informó en 41 % de los pacientes con malaria, frecuencia sin diferencia significativa en comparación con los pacientes sin malaria (32 %) (52); resultados similares se informaron en Sudán, en donde 77 de 331 (23,3 %) pacientes con malaria presentaron piuria, porcentaje parecido al de pacientes febriles sin malaria (24,5 %) (100).

Uno de los patrones clínicos de la lesión renal en el paciente con malaria es el desarrollo de nefritis intersticial aguda, la cual, si bien se ha reportado en modelos animales luego de la vacunación con antígenos de *P. falciparum* (101,102), no se ha informado como una lesión aislada en pacientes con malaria por *P. falciparum* sino asociada a necrosis tubular aguda y lesión glomerular (48,103,104). Se ha informado leucocituria en pacientes sin malaria pero con nefritis intersticial aguda (105,106), alteración que se informado hasta en 82 % de los pacientes con nefritis intersticial inducida por fármacos (105).

Varias enfermedades tropicales, entre ellas algunas infecciones parasitarias, se han asociado con la piuria estéril (107), y las infecciones por *Plasmodium* podrían estar relacionadas con esta alteración; sin embargo, se necesitan más investigaciones que aclaren su significado, puesto que la leucocituria puede indicar un amplio rango de condiciones, desde la nefritis intersticial hasta las infecciones de las vías urinarias.

Barrera S, Tobón-Castaño A Biomédica 2017;37:590-9

Otras alteraciones. Se han descrito otras alteraciones en el análisis de orina en la malaria, como la presencia de cetonas y nitritos (52,63,66,85), y se ha visto que presentan una correlación positiva con la parasitemia (85), pero no es claro su significado.

El estudio más reciente en Colombia se llevó a cabo con 620 pacientes de malaria por *P. falciparum* o *P. vivax* (108), y en él se observaron interrelaciones entre diversas variables del análisis de orina que indican el compromiso simultáneo de órganos con alteraciones metabólicas durante la malaria. Las alteraciones más frecuentes fueron la bilirrubinuria, la proteinuria, la urobilinuria y el aumento de la densidad específica. Algunas de estas alteraciones fueron más frecuentes en pacientes graves; la proteinuria y la bilirrubinuria se asociaron estadísticamente con la disfunción hepática y la renal, y la cetonuria con las alteraciones neurológicas. En general, la urobilinuria se relacionó con un mayor riesgo de malaria grave.

Si bien las alteraciones en la orina se han relacionado con lesiones específicas y pueden advertir sobre el desarrollo de la malaria complicada, su diagnóstico se confirma mediante marcadores séricos como la creatinina, en el caso de la lesión renal (109), o la bilirrubina sérica y las transaminasas en el caso de la ictericia secundaria (9,110). Las alteraciones en el análisis de orina en el paciente con malaria constituyen signos clínicos de peligro, cuya aparición nos informa de la evolución de la enfermedad hacia una condición complicada (11), especialmente por el reconocimiento de la disfunción hepática y la renal, complicaciones frecuentes en la malaria, pero también de otras lesiones como la hemólisis y la rabdomiolisis según los estudios incluidos en esta revisión.

Son pocos los estudios publicados que utilizan el análisis de orina como herramienta diagnóstica en los pacientes con malaria, o que valoran su utilidad para detectar las lesiones de órgano. Este examen es un método diagnóstico de fácil aplicación en la consulta externa e, incluso, en pacientes hospitalizados, y permite la detección oportuna de diferentes lesiones en el paciente con malaria, contribuyendo así a la reducción de la morbilidad grave y la mortalidad.

#### Agradecimientos

A la Universidad de Antioquia.

#### Conflicto de intereses

Ninguno.

#### **Financiación**

Estudio financiado con recursos de la Vicerrectoría de Investigación, Facultad de Medicina y Grupo Malaria de la Universidad de Antioquia.

#### Referencias

- World Health Organisation. World malaria report 2014. Geneva: WHO; 2014.
- World Health Organization. World Malaria Report 2015. Geneva: WHO: 2015.
- UNICEF, World Health Organization, The World Bank, United Nations. Level & Trend in Child Mortality. Report 2014. New York: United Nations Children's Fund; 2014.
- White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. Lancet. 2014;383:723-35. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60024-0
- Maestre AE. Plasmodios. En: Díaz FJ, Estrada S, Franco L, Maestre AE, Ospina S, Robledo C, et al., editores. Microbiología de las infecciones humanas. Primera edición. Medellin: Corporacion para Investigaciones Biologicas; 2007. p. 340–51.
- Ospina M, Mancel E, Pacheco O, Quijada H. Enfermedades trasmitidas por vectores. Malaria. Boletín Epidemiológico Semanal. 2015;52:35-9.
- Walker NF, Nadjm B, Whitty CJM. Malaria. Medicine (Baltimore). 2014;42:100-6. https://doi.org/10.1016/j.mpmed. 2013.11.011
- 8. **Suh KN, Kain KC, Keystone JS.** Malaria. CMAJ. 2004;170: 1693-702. https://doi.org/10.1503/cmaj.1030418
- World Health Organization. Treatment of severe malaria. Guidelines For The Treatment of Malaria. Geneve: WHO; 2015. p. 71-88.
- Baird JK. Neglect of Plasmodium vivax malaria. Trends Parasitol. 2007;23:533-9. https://doi.org/10.1016/j.pt.2007. 08.011
- Tobón-Castaño A. Signos de peligro en el paciente con malaria. Biomédica. 2009;29:320-9. https://doi.org/10.7705/ biomedica.v29i2.33
- Tobón-Castaño A, Piñeros-Jiménez JG, Blair-Trujillo S, Carmona-Fonseca J. Clínica de la malaria complicada debida a P. falciparum. Estudio de casos y controles en Tumaco y Turbo (Colombia). latreia. 2006;19:339-55.
- Tobón-Castaño A, Giraldo-Castro C, Blair-Trujillo S. Utilidad de los signos clínicos y parasitológicos en el pronóstico de la malaria grave en Colombia. Biomédica. 2012; 32:79-94. https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i0.613
- 14. O'Brien AT, Ramírez JF, Martinez SP. A descriptive study of 16 severe *Plasmodium vivax* cases from three municipalities of Colombia between 2009 and 2013. Malar J. 2014;13:404. https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-404
- 15. Gupta BK, Gupta A, Nehra HR, Balotia HR, Meena SL, Kumar S. Clinical profile and prognostic indicators in adults hospitalized with severe malaria caused by different *Plasmodium* species. Infect Dis (Auckl).2015;8:45-50. https://doi.org/10.4137/IDRT.S34039
- Arboleda M, Pérez MF, Fernández D, Usuga LY, Meza M. Perfil clínico y de laboratorio de los pacientes con malaria por

Plasmodium vivax, hospitalizados en Apartadó, Colombia. Biomédica. 2012;32 (Suppl. 1):58-67. https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i0.599

- 17. González L, Guzmán M, Carmona-Fonseca J, Lopera T, Blair S. Características clinico-epidemiológicas de 291 pacientes hospitalizados por malaria en Medellin (Colombia). Acta Médica Colomb. 2000;25:165-70.
- Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A. Plasmodium vivax malaria. Emerg Infect Dis. 2005;11:132-4. https://doi.org/10.3201/eid1101.040519
- Tangpukdee N, Thanachartwet V, Krudsood S, Luplertlop N, Pornpininworakij K, Chalermrut K, et al. Minor liver profile dysfunctions in *Plasmodium vivax*, *P. malariae* and *P. ovale* patients and normalization after treatment. Korean J Parasitol. 2006;44:295-302. https://doi.org/10.3347/kjp. 2006.44.4.295
- Cortina A del M, Tobón-Castaño A. Jaundice and hepatopathy in patients with malaria. Infectio. 2010;14:277-85.
- Anand AC, Puri P. Jaundice in malaria. J Gastroenterol Hepatol. 2005;20:1322-32. https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2005.03884.x
- Abro AH, Ustadi AM, Abro HA, Abdou AS, Younis NJ, Akaila SI. Jaundice with hepatic dysfunction in *P. falciparum* malaria. J Coll Physicians Surg Pak. 2009;19:363-6. https:// doi.org/06.2009/JCPSP.363366
- Kochar DK, Singh P, Agarwal P, Kochar SK, Pokharna R, Sareen PK. Malarial hepatitis. J Assoc Physicians India. 2003;51:1069-72.
- 24. Aloni MN, Nsibu CN, Meeko-Mimaniye M, Ekulu PM, Bodi JM. Acute renal failure in Congolese children: A tertiary institution experience. Acta Paediatr. 2012;101:e514-8. https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2012.02827.x
- Mishra SK, Mahanta KC, Mohanty S. Malaria associated acute renal failure-experience from Rourkela, Eastern India. J Indian Med Assoc. 2008;106:640-2.654.
- 26. **Kapoor K, Gupta S.** Malarial acute kidney injury in a paediatric intensive care unit. Trop Doct. 2012;3:203-5. https://doi.org/10.1258/td.2012.120196
- 27. Kute VB, Shah PR, Munjappa BC, Gumber MR, Patel H V, Jain SH, et al. Outcome and prognostic factors of malariaassociated acute kidney injury requiring hemodialysis: A single center experience. Indian J Nephrol. 2012;22:33-8. https://doi.org/10.4103/0971-4065.83737
- Trang TT, Phu NH, Vinh H, Hien TT, Cuong BM, Chau TT, et al. Acute renal failure in patients with severe falciparum malaria. Clin Infect Dis. 1992;15:874-80.
- 29. Kalinga A, Mayige M, Kagaruki G, Shao A, Mwakyusa B, Jacob F, et al. Clinical manifestations and outcomes of severe malaria among children admitted at Rungwe and Kyela district hospitals in south-western Tanzania. Tanzan J Health Res. 2012;14:3-8.
- 30. Imbert P, Candito D, Ka S, Sartelet I, Baujat G, Rogier C. Severe malaria in children from the seasonal low-transmission zone of Senegal: Effect of age on the clinical manifestations. Dakar Med. 1997;42:44-8.
- Idro R, Bitarakwate E, Tumwesigire S, John CC. Clinical manifestations of severe malaria in the highlands of southwestern Uganda. Am J Trop Med Hyg. 2005;72:561-7.

- 32. Medina-Morales DA, Montoya-Franco E, Sánchez-Aristizábal V del P, Machado-Alba JE, Rodríguez-Morales AJ. Severe and benign *Plasmodium vivax* malaria in Emberá (Amerindian) children and adolescents from an endemic municipality in Western Colombia. J Infect Public Health. 2016;9:172-80. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.09.001
- Tobón-Castaño A, Cortina A del M, Miranda AF, Blair Trujillo S. Orina oscura e ictericia como signos de peligro en malaria por *Plasmodium falciparum* en Colombia. Rev Cubana Med Trop. 2010;2:28-35.
- 34. Luby SP, Kazembe PN, Redd SC, Ziba C, Nwanyanwu OC, Hightower W, et al. Using clinical signs to diagnose anaemia in African children. Bull World Health Organ. 1995;73:477-82.
- Phu NH, Hien TT, Hoang Mai NT, Hong Chau TT, Chuong L Van, Loc PP, et al. Hemofiltration and Peritoneal dialysis in infection-associated acute renal failure in Vietnam. N Engl J Med. 2002;347:895-902. https://doi.org/10.1056/ NEJMoa020074
- Kochar D, Kumawat BL, Karan S, Kochar SK, Agarwal RP. Severe and complicated malaria in Bikaner (Rajasthan), western India. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1997;28:259-67.
- Abdul Manan J, Ali H, Lal M. Acute renal failure associated with malaria. J Ayub Med Coll Abbottabad. 2006;18:47-52. https://doi.org/10.4103/1319-2442.121298
- Das BS. Renal failure in malaria. J Vector Borne Dis. 2008;45:83-97.
- Mishra SK, Das BS. Malaria and acute kidney injury. Semin Nephrol. 2008;28:395-408. https://doi.org/10.1016/j. semnephrol.2008.04.007.
- Shukla VS, Singh RG, Rathore SS. Outcome of malariaassociated acute kidney injury: A prospective study from a single center. Ren Fail. 2013;35:801-5. https://doi.org/10.31 09/0886022X.2013.800808
- 41. Clark IA, Cowden WB. The pathophysiology of falciparum malaria. Pharmacol Ther. 2003;99:221-60. https://doi.org/10.1016/S0163-7258(03)00060-3
- Panda SK, Das MC, Meher LK, Rathod PK. Risk factors for acute renal failure in severe falciparum malaria. Indian J Nephrol. 2003;13:55-8.
- Naqvi R, Ahmad E, Akhtar F, Naqvi A, Rizbi A. Outcome in severe acute renal failure associated with malaria. Nephrol Dial Transplant. 2003;18:1820-3.
- AI-Mendalawi MD. Acute renal failure associated with malaria in Children. Saudi J Kidney Dis Transplant. 2013;24: 1255. https://doi.org/10.4103/1319-2442.121298
- 45. Miranda-Arboleda AF, Martínez-Salazar EL, Tobón-Castaño A. El riñón en la malaria: de la patogenia a las manifestaciones clínicas. Infectio. 2014;18:120-8. https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.05.003
- Ingelfinger JR, Chawla LS, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. N Engl J Med. 2014;371:58-66. https://doi.org/10.1056/NEJMra1214243
- Barsoum RS. Malarial acute renal failure. J Am Soc Nephrol. 2000;11:2147-54.

Barrera S, Tobón-Castaño A Biomédica 2017;37:590-9

48. **Barsoum RS.** Malarial nephropathies. Nephrol Dial Transplant. 1998;13:1588-97.

- Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. Lancet. 2012;380:756-66. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61454-2
- Arévalo-Herrera M, López-Pérez M, Medina L, Moreno A, Gutiérrez JB, Herrera S. Clinical profile of *Plasmodium* falciparum and *Plasmodium vivax* infections in low and unstable malaria transmission settings of Colombia. Malar J. 2015;14:1-11. https://doi.org/10.1186/s12936-015-0678-3
- O'Donnell A, Weatherall DJ, Taylor AM, Reeder JC, Allen SJ. Muscle cell injury, haemolysis and dark urine in children with falciparum malaria in Papua New Guinea. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006;100:817-25. https://doi.org/10.1016/j. trstmh.2005.11.015
- Ugwuja El, Ugwu NC. Abnormal findings on dipstick urinalysis of out-patients with malaria in Abakaliki, Nigeria. J Vector Borne Dis. 2011;48:205-9.
- Saravu K, Rishikesh K, Parikh CR. Risk factors and outcomes stratified by severity of acute kidney injury in malaria. PLoS One. 2014;9:e90419. https://doi.org/10.1371/ journal.pone.0090419
- 54. Mohapatra BN, Jangid SK, Mohanty R. GCRBS score: A new scoring system for predicting outcome in severe falciparum malaria. J Assoc Physicians India. 2014;62:14-7.
- 55. Khan W, Zakai HA, Umm-E-Asma. Clinico-pathological studies of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria in India and Saudi Arabia. Acta Parasitol. 2014;59: 206-12. https://doi.org/10.2478/s11686-014-0227-1
- 56. Campuzano-Maya G, Arbeláez-Gómez M. El uroanálisis: un gran aliado del médico. Urol Colomb. 2007;16:67-92.
- 57. Campuzano-Maya G, Arbeláez-Gómez M. Uroanálisis: más que un examen de rutina. Med Lab. 2006;12:511-56.
- Kavouras S. Assessing hydration status. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2002;5:519-24.
- Morales-Peñaloza G, Valero-Cely F, Gaona JL. Hematuria microscópica. Urol Colomb. 2003;12:31-44.
- Sudhanshu PS, Mishra SK. Can Urine Dipstick test detect renal impairment in *Plasmodium falciparum* malaria in a rural setup? Trop Doct. 2010;40:106-7. https://doi.org/10.1258/ td.2010.090382
- Bodi JM, Nsibu CN, Longenge RL, Aloni MN, Akilimali PZ, Tshibassu PM, et al. Blackwater fever in Congolese children: A report of clinical, laboratory features and risk factors. Malar J. 2003;12:205. https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-205
- Ajetunmobi WA, Orimadegun AE, Brown BJ, Afolabi NK, Olabiyi FA, Anetor JI, et al. Haemoglobinuria among children with severe malaria attending tertiary care in Ibadan, Nigeria. Malar J. 2012;11:336. https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-336
- Karoum Ael G, Mohammed BA. Urine analysis in malaria in Kassala Town, Eastern Sudan. Saudi J Kidney Dis Traspl. 2013;24:376-8.
- 64. Lon C, Spring M, Sok S, Chann S, Bun R, Ittiverakul M, et al. Blackwater fever in an uncomplicated *Plasmodium falciparum* patient treated with dihydroartemisinin-piperaquine. Malar J. 2014;13:96. https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-96

- 65. Khan FY, Al-haddad D. An imported case of P. falciparum malaria presenting as black water fever with acute renal failure. Travel Med Infect Dis. 2009;7:378-80. https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2009.11.002
- Sowunmi A. Renal function in acute falciparum malaria. Arch Dis Child. 1996;74:293-8.
- 67. Weber MW, Zimmermann U, Van Hensbroek MB, Frenkel J, Palmer A, Ehrich JH, et al. Renal involvement in Gambian children with cerebral or mild malaria. Trop Med Int Heal. 1999;4:390-4. https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1999.00409.x
- 68. Waller KV, Ward KM, Mahan JD, Wismatt DK. Current concepts in proteinuria. Clin Chem. 1989;35:755-65.
- 69. Ehrich JH, Horstmann RD. Origin of proteinuria in human malaria. Trop Med Parasitol. 1985;36:39-42.
- Rafieian-Kopaei M, Nasri H, Alizadeh F, Baradaran A. Immunoglobulin A nephropathy and malaria falciparum infection; a rare association. Iran J Publ Heal. 2013;42: 529-33.
- 71. **Sitprija V.** Nephropathy in falciparum malaria. Kidney Int. 1988;34:867-77. https://doi.org/10.1038/ki.1988.262
- Mehta RL, Chertow GM. Acute renal failure definitions and classification: Time for change?. J Am Soc Nephrol. 2003; 14:2178-87. https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000079042. 13465.1A
- Baum N, Dichoso CC, Carlton E. Blood urea nitrogen and serum creatinine physiology and interpretations. Urology. 1975;40:583-8. https://doi.org/10.1016/0090-4295(75)90105-3
- 74. Hanson J, Lee SJ, Hossain MA, Anstey NM, Charunwatthana P, Maude RJ, et al. Microvascular obstruction and endothelial activation are independently associated with the clinical manifestations of severe falciparum malaria in adults: An observational study. BMC Med. 2015;13:122.https://doi.org/10.1186/s12916-015-0365-9
- Lombardi R, Zampedri L, Rodríguez I, Alegre S, Ursu M,
   Di Fabio M. Prognosis of acute renal failure in children: A multivariate analysis. Ren Fail. 1998;20:725-32.
- Karnik AM, Bashir R, Khan FA, Carvounis CP. Renal involvement in the systemic inflammatory reaction syndrome. Ren Fail. 1998;20:103-16.
- 77. **Briceño I.** Sepsis: etiología, manifestaciones clínicas y diagnóstico. MEDICRIT Rev Med Crítica. 2005;2:203-13.
- White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. Lancet. 2014;383:723-35. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60024-0
- 79. **Mishra SK, Mohapatra S, Mohanty S.** Jaundice in falciparum malaria. J Indian Acad Clin Med. 2003;4:12-3.
- Llanos C, Flórez MH, Herrera MA, Herrera S. Mecanismos de generación de anemia en malaria. Colomb Med. 2004;35: 205-14.
- Ahmed AMM, Galib MB. Intracellular cholestasis: A rare complication of malaria falciparum infection. Arab J Gastroenterol. 2012;13:35-7. https://doi.org/10.1016/j.ajg. 2012.02.001
- Fazil A, Vernekar P V, Geriani D, Pant S, Senthilkumaran S, Anwar N, et al. Clinical profile and complication of malaria hepatopathy. J Infect Public Health. 2013;6:383-8. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2013.04.003

83. **Fulop M, Katz S, Lawrence C.** Extreme hyperbilirubinemia. JAMA. 1971;127:254-8. https://doi.org/10.1001/archinte. 1971.00310140082010

- 84. Pati SS, Mishra SK, Mohanty S, Pattnaik JK, Das BS. Influence of renal impairment on plasma concentrations of conjugated bilirubin in cases of *Plasmodium falciparum*. Ann Trop Med Parasitol. 2003;97:581-6.
- 85. Ephraim R, Tashie W, Agbodzakey H, Sakyi SA, Essien-Baidoo S, Adoba P, et al. Dipstick urinalysis findings in children with *Plasmodium falciparum* in the South Tongu District: A case-control study. Niger Med J. 2015;56:292-6. https://doi.org/10.4103/0300-1652.169748
- Perazella MA. The urine sediment as a biomarker of kidney disease. Am J Kidney Dis. 2015;66:748-55. https://doi. org/10.1053/j.ajkd.2015.02.342
- 87. Morenikeji OA, Eleng IE, Atanda OS, Oyeyemi OT. Renal related disorders in concomitant *Schistosoma haematobium-Plasmodium falciparum* infection among children in a rural community of Nigeria. J Infect Public Health. 2015;9:136-42. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.06.013
- 88. Singh R, Kumar S, Rana SK, Thakur B, Singh SP. A comparative study of clinical profiles of vivax and falciparum malaria in children at a tertiary care centre in Uttarakhand. J Clin Diagnc Res. 2013;7:2234-7. https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/6914.3479
- Knochel, JP, Moore G. Rhabdomyolisis in malaria. N Engl J Med. 1993;329:1206-7. https://doi.org/10.1056/ NEJM199310143291618
- Mishra SK, Pati SS, Mahanta KC, Mohanty S. Rhabdomyolysis in falciparum malaria - a series of twelve cases (five children and seven adults). Trop Doct. 2010;40:87-8. https://doi.org/10.1258/td.2009.090387
- Miller KD, White NJ, Lott JA, Roberts JM, Greenwood BM. Biochemical evidence of muscle injury in African children with severe malaria. J Infect Dis. 1989;159:139-42.
- Davis TM, Pongponratan E, Supanaranond W, Pukrittayakamee S, Helliwell T, Holloway P, et al. Skeletal muscle involvement in falciparum malaria: Biochemical and ultrastructural study. Clin Infect Dis. 1999;29:831-5. https:// doi.org/10.1086/520444
- Reynaud F, Mallet L, Lyon A, Rodolfo JM. Rhabdomyolysis and acute renal failure in *Plasmodium falciparum* malaria. Nephrol Dial Transplant. 2005;20:847-55. https://doi.org/10. 1093/ndt/gfh686
- 94. Prabhakar, Rathore SS, Choudhury TA, Kishan A, Gupta T, Prakash J. Rhabdomyolysis Induced acute renal failure: A rare complication of falciparum malaria. J Assoc Physicians India. 2014;62:865-6.
- Bosch X, Poch E, Grau JM. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. N Engl J Med. 2009;361:62-72. https://doi. org/10.1056/NEJMra0801327
- Sinniah R, Lye W. Acute renal failure from myoglobinuria secondary to myositis from severe falciparum malaria. Am J Nephrol. 2000;20:339-43. https://doi.org/10.1159/000013611

- Siqueira AM, Alexandre MA, Mourao MP, Santos VS, Nagahashi-Marie SK, Alecrim MG, et al. Severe rhabdomyolysis caused by *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2010;83:271-3. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0027.
- Knochel JP, Moore G. Rhabdomyolosys in malaria. N Engl J Med. 1993;329:1206-7. https://doi.org/10.1056/ NEJM199310143291618
- Binder L, Smith D, Kupka T, Nelson B, Glass B, Wainscott M, et al. Abnormalities of urine urobilinogen and urine bilirubin assays and their relation to abnormal results of serum liver function tests. South Med J. 1988;81: 1229-32.
- Karoum-Osman AE, Mohammed BA. Urine analysis in malaria in Kassala Town, Eastern Sudan. Sauddi J Kidney Dis Transplant. 2000;11:208-10.
- Lloyd CM, Wozencraft AO, Williams DG. Cell-mediated pathology during murine malaria-associated nephritis. Clin Exp Immunol. 1993;94:398-402. https://doi.org/10.1111/ j.1365-2249.1993.tb08208.x
- 102. Nagatake T, Broderson JR, Tegoshi T, Collins WE, Aikawa M. Renal pathology in owl monkeys vaccinated with *Plasmodium falciparum* asexual blood-stage synthetic peptide antigens. Am J Trop Med Hyg.1992;47:614-20. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.47.614
- Prakash J, Singh AK, Gujrati S, Maheshwari A. Acute renal failure in malaria: Changing trends. Indian J Nephrol. 2002;12:113-7.
- 104. Eiam-Ong S, Sitprija V. Falciparum malaria and the kidney: A model of inflammation. Am J Kidney Dis. 1998;32:361-75. https://doi.org/10.1053/ajkd.1998.v32.pm9740151
- 105. González E, Gutiérrez E, Galeano C, Chevia C, de Sequera P, Bernis C, et al. Early steroid treatment improves the recovery of renal function in patients with drug-induced acute interstitial nephritis. Kidney Int. 2008;73:940-6. https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002776
- 106. Goicoechea M, Rivera F, López-Gómez JM. Increased prevalence of acute tubulointerstitial nephritis. Nephrol Dial Transplant. 2013;28:112-5. https://doi.org/10.1093/ ndt/gfs143
- Longo DL, Wise GJ, Schlegel PN. Sterile Pyuria. N Engl J Med. 2015;372:1048-54. https://doi.org/10.1056/ NEJMra1410052
- 108. Tobón-Castaño A, Barrera Escobar S, Giraldo Castro C. Urinalysis and Clinical Correlations in Patients with P. vivax or P. falciparum Malaria from Colombia. J Trop Med. 2017; ID: 7868535. https://doi.org/10.1155/2017/7868535
- 109. Hanson J, Hasan MM, Royakkers AA, Alam S, Charunwatthana P, Maude RJ, et al. Laboratory prediction of the requirement for renal replacement in acute falciparum malaria. Malar J. 2011;10:217. https://doi. org/10.1186/1475-2875-10-217
- World Health Organization. Management of severe malaria. 1st ed. Geneva: WHO; 2012. p. 7-8.

#### IN MEMÓRIAM

# Francisco de Paula Rodríguez 1945-2017

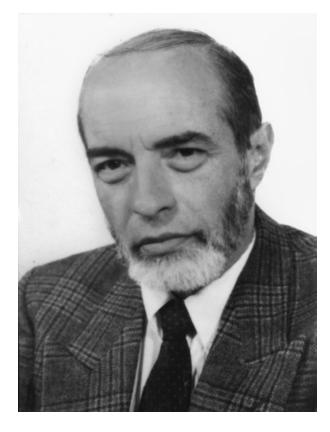
Carlos Arturo Hernández

Revista Biomédica, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

El pasado 27 de julio falleció en Bogotá el señor Francisco de Paula Rodríguez Lesmes después de una penosa enfermedad que sufrió durante los últimos cinco años. Le sobreviven su esposa, Myriam Gabanzo, y sus hijas Diana Ivonne y Mónica Estefanía.

Pachito, como era llamado cariñosamente por familiares y amigos, adelantó parte de sus estudios de secundaria en el Instituto San Bernardo de los Hermanos Maristas y se graduó de bachiller en el Colegio Winston Churchill en 1966. Ingresó a la Escuela de Arte de la Fundación Universidad de Bogotá "Jorge Tadeo Lozano" en donde obtuvo el título de "Experto en Diseño Gráfico". Inicialmente trabajó en dibujo y montaje en Lito Siglo XX en donde permaneció siete meses. El 1° de agosto de 1972 ingresó como "Auxiliar de Artes Gráficas", al Grupo de Imprenta y Publicaciones de la Sección de Servicios Generales de la División Administrativa del Instituto Nacional para Programas Especiales en Salud, INPES, bajo la coordinación de Carlos Alberto Rosas Rozo; posteriormente fue nombrado "Dibujante I-7".

Francisco siempre buscó mantenerse actualizado en los cambios que se iban presentando en el campo de las artes gráficas para lograr un mejor desempeño en sus labores en el Instituto. En 1982, se entrenó en Diagramación Editorial en "Profesionales Gráficos"; más tarde, en 1990, y acorde con los avances mundiales en el campo de las publicaciones en todo lo relacionado con la diagramación digital, estudió los programas Page Maker y Free Hand. Más tarde, Pachito tomó el curso sobre los avances en preprensa digital que dictó el Instituto para la Formación y el Desarrollo Tecnológico de la Industria Gráfica (IFTAG) de la Asociación Colombiana de Industrias Gráficas (Andigraf). En 1998, cuando la revista Biomédica empezó a formar parte del proyecto SciELO (Scientific Electronic Library Online) de la Biblioteca Virtual en Salud de la Organización Panamericana de la Salud, se entrenó en la metodología de esta



plataforma virtual en el curso dictado en las instalaciones de la Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario.

El diseño editorial original de la revista *Biomédica* fue hecho por Francisco, al igual que las modificaciones que sufrió la carátula de la revista al incorporar una fotografía en su carátula; siempre fue su publicación predilecta y le dedicaba todo su esfuerzo y empeño. Posiblemente, es la única otra persona que conozco que se leía concienzudamente todos y cada uno los artículos que se publicaban, al punto que hubo ocasiones en que 'respetuosamente' me decía que 'creía' que se nos había pasado un error en una palabra mal utilizada o mal acentuada, o en una oración mal punteada o ininteligible.

Además de sus habilidades y conocimientos en diseño gráfico, Pachito dedicaba sus ratos libres a la pintura y a la fotografía, y su talento fue reconocido en varios concursos de empleados oficiales a nivel nacional. Infortunadamente, nunca quiso compartir su obra con sus compañeros de labores y la reservó para sus seres queridos y para aquellos cercanos a su entorno familiar, en cuyos hogares reposan dichos aportes artísticos.

Es una lástima que el Instituto Nacional de Salud no tenga en su haber una condecoración o un reconocimento especial para aquellos funcionarios que han dado lo mejor de sí mismos por mantener la excelencia de un producto del Instituto. Si la hubiera, Pachito debería ser uno de sus recipendarios, pues gracias a su tesón y entrega el país cuenta con documentos tales como los informes de los dos estudios nacionales de salud, la revista *Biomédica*, el *Informe Quincenal Epidemiológico Nacional* en su forma impresa, el libro de *Microscopía electrónica* 

de la infección viral y el de Lepra, el libro publicado para la celebración del octagésimo aniversario: Instituto Nacional de Salud, 1917-1997: una historia, un compromiso, los de violencia intrafamiliar, el boletín Neumococo, los afiches de los múltiples encuentros nacionales e internacionales realizados en el Instituto y hasta las etiquetas de vacunas, sueros y otros productos biológicos.

Siempre lo recordaremos como una persona seria, entregada a su trabajo, adusta, que disgustaba de los halagos a su labor y que no expresaba admiración por algún logro de alguien si creía que no se lo merecía. Fue mucho lo que nos enseñó con su ejemplo y con su accionar. Nuestros más sinceros agradecimientos por todo esto y por todo lo que no se ha mencionado de él.

Paz en su tumba y loor a la integridad y la entereza demostrada en todo lo que emprendió en su vida familiar y en su trabajo.

#### Biomédica

#### INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Volumen 37, números 1, 2, 3, 4, suplementos 1 y 2

#### Lista de evaluadores 2017

El Comité Editorial de *Biomédica* agradece a los evaluadores nacionales y extranjeros por su contribución al continuo avance de la revista.

Abad Esteban Ahumada Martha Liliana Alarcón Belkisyolé Alave Jorge Luis Aldana Elis Álvarez Carlos Alvís-Zakzuk Nelson José

AMS-Zakzuk Nelson Jos Arango Magnolia Aravena Pedro Arboleda Margarita Argote César Arturo Aristizábal Chantal Arroyo Bárbara Julia Arteaga Claudia Arteaga Griselda Atehortúa Sara Catalina

Bancalari Aldo
Bejarano Eduar Elías
Bermúdez Olga María
Bermúdez Sonia
Bernal Jennifer
Beron Corina Marta
Blanco Luis Camilo
Blanco Pedro
Bonifaz Alexandro
Borges Adolfo
Boshell Jorge
Brenner Pola
Briceño Ignacio
Brochero Helena
Buendía Jefferson Antonio

Cabrera Olga Lucía Cáceres Omar Alberto Calao Clelia Rosa Calderón Claudia Camacho Marcela Camargo María Constanza Camou Teresa Camoo-Arias Adalberto

Cano Carlos
Cantillo Omar
Cárdenas Rocío
Cardona Nora
Carracedo Ángel
Carrasco Sira

Carrasquilla María Cristina Carrillo Ana Julia Carrillo Gloria Mabel Cartier Luis

Carvajal José Joaquín Carvajal Rocío Castaño Jhon Carlos
Castaño Oscar Mauricio
Castell-Rodríguez Andrés Eliú
Castillo Jorge Alejandro
Cattana María E.
Cepeda Magda
Chaparro Jacqueline
Chaparro Pablo Enrique
Chaves Luis Fernando
Colombo Valeria
Córdoba Lucas
Córdoba Rodrigo
Córdoba Susana
Cordovez Juan Manuel
Correa Adriana

Cortés Edgar
Cortés Jorge Alberto
Corti Marcelo
Cristale Joyce
Cuervo Francisco
Cuervo Patricia
Cuervo Sonia Isabel
Cuevas Miguel
da Silva Rodrigo Cayô
Dantur Juri María Julia
Del Castillo Sara
Devera Rodolfo
Díaz Francisco Javier

Correa Margarita M.

Dorairaj Syril K.
Duque Jonny Eduardo
Echeverry Jairo
Escobar Jesús Eduardo
Espinal Paula
Esteban Lvda

Díaz Sonia

Esteve-Gassent María Dolores

Estrada Santiago
Feliciangeli Dora
Fernández Luis René
Figueras Josep
Flórez Astrid Carolina
Franco Roberto
Fuya Patricia
Gallego Liliana
Gamarra Germán
Gamonal Jorge
Garate Teresa
García José

Garciaherreros Plutarco

Gómez Betty

Gómez Carlos Gómez Héctor Gómez Jorge Enrique Gómez Julio Cesar González Ana Julia González Francisco González María Elena

Guerrero Rafael
Gugliemonne Alberto
Guhl Felipe
Gutiérrez Javier
Gutkind Gabriel
Herazo Edwin
Herrera Manuela
Hidalgo Marilyn
Hoyos Richard
Ibarra Carlos

Jiménez Mónica Marcela

Komar Nicholas
Laplana Marina
Llerena Claudia Regina
López José Julián
López Juan Javier
López Marcos
López Paulina
Lorenz Camila
Mafla Ana Cristina
Maisanaba Sara
Maldonado María Elena

Mantilla José Marino Susana Márquez Margarita Márquez María Elena Martín Javier Martínez Abisai Martínez Ernesto Martínez José William Martrat Eulalia Ros Máttar Salim Mayorga Rubén Meléndez Iván Méndez Jonh Jairo Miranda Jorge Molina Darjaniva Molina Edgardo Molina Jorge Moncada Ligia Inés

Montoro Ernesto Mougabure-Cueto Gastón

Monroy Carlota

Moya José

Munstermann Leonard Muñoz i-Navarro Roger Muñoz-Almagro Carmen Murcia Martha Isabel Muskus Carlos

Narváez Javier Nava Gerardo

Navarrete Myriam Lucía

Navarro Edgar Ocampo Clara Ochoa María Teresa Olano Juan Pablo Olano Víctor Oñate José Millán Orozco José Ortiz Roberth Alirio Ospina Sigifredo Pallares Christian Palmero Domingo Juan Papale Rosa María Pardo Liz Carolina Parra Gabriel Jaime Pérez Ana Paula Pérez Luis Alfonso Picotto Leandro Daniel Pineda Nicolás

Porras Alexandra Possani Lourival Domingos

Pradilla Gustavo Prieto Luz Marina Puerto Gloria Puppo Corina Quintero-Martínez Diana Carolina

Quiñones Martha Lucía Ramírez José Luis Ramón Daniel Restrepo Berta Nelly Reyes Enrique Ribón Wellman Ritacco Viviana Rivas Fabio

Rivara Pablo
Rivera Diana Patricia
Robledo Jaime
Robledo Sergio
Rodríguez Gerzaín
Rodríguez Leocadio
Rodríguez-Bataz Elvia
Rodríguez-Villamizar Laura

Rojas Juan Pablo Román Gustavo Romanelli Hugo

Romo-González Carolina Rossi Gustavo C. Rubio-Palis Yasmín Rueda Blanca Ruiz Raiza

Sabogal Amparo Liliana

Sáez Amadeo

Salazar-Sánchez Lizbeth Sans Mónica Santacoloma Liliana Santamaría Erika Santibañez Sonia Sarmiento Diana Sarria-S. Fabio Seija Verónica

Sepúlveda Juan Carlos Sierra Pilar

Silva Federico Silva Nora

Silva Telles María Alice Stashenko Elena Strottmann Daisy Suárez Martha Cecilia Téllez Juan Luis Torres Ana Forero

Torres Carlos
Torres Carolina
Torres Mariela
Trejo Ruby
Trigoso Christian
Uribe Sandra
Usme José A.
Valarezo Paul
Vallejo Gustavo
Velandia Myriam
Vélez Iván Darío
Vélez Lázaro

Vesga Juan Fernando

Vivero Rafael

Walteros Diana Marcela

Yepes Ismael

Zamora Mireya Zapata Juan Carlos Zúñiga Clemente

#### Biomédica

#### INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Volumen 37, números 1, 2, 3, 4, suplementos 1 y 2

#### Índice de autores

Abril Lina Alejandra, 466
Acosta Claudia Patricia, 191
Agudelo Carlos Andrés, 62
Agudelo Paola, 62
Agudelo Yuli, 62
Agudelo-Flórez Piedad, 486
Aguilar-Jiménez Wbeimar, 267
Aguiñiga Itzen, 571
Alarcón Ángela, 507
Alba Sandra, 516
Alcalá Lucas, s2-180
Almaquer Michel, 452

Almirón Walter Ricardo, s2-67 Alvarado Uriel, s2-167 Alvis-Guzmán Nelson Rafael, 397 Alvis-Zakzuk Nelson José, 397 Alzase-Carvajal Catalina, s1-43

Allassia Sonia, 164

Andrade-Ochoa Sergio, s-224 Angulo Víctor Manuel, 42, 68, 274

Aranibar Mónica, 164 Araque María, 209 Arciniegas Antonio J., s1-57 Arévalo Luisa Leonor, 308 Arias Gerson Fitzgerald, 353 Arias Gerson, 466

Arias Gerson, 46 Arias Jesús, 34

Arias-Murillo Yazmín, 175, 184 Ariza-Araújo Yoseth, s2-59 Aroca Gustavo, 260

Arrieta Katherine Margarita, 308 Arrivillaga-Henríquez Jazzmín, s2-83

Arroyave Esteban, s1-75 Artunduaga Jhon Jhamilton, 11

Astorga Mixtli, s2-77

Astudillo-García Claudia Iveth, 368, s1-92

Atehortúa Santiago, 62 Avendaño-Tamayo Efrén, 486 Ávila Boris Santiago, 561 Badel-Mogollón Jaime, s2-106 Barbosa Claudia Viviana, 378 Barrera Sebastián, 590

Barrera Sebastian, 590 Bascuñán Priscila, s2-98 Bayona Brayan, 184 Bedoya César, 425 Bedoya Gabriel, 267, 486, s2-143

Bejarano Eduar Elías, s2-187

Beltrán-Durán Mauricio, 175, 184, 361, 473

Benavides Elizabeth, 416 Benítez Washington, s2-83 Benjumea María Victoria, 526 Bermúdez María Isabel, 361 Bernal-Vargas Mónica Alejandra, 104

Berrío Maritza, 361

Bertolotti María Alejandra, s2-67 Blanco Pedro J, s1-75

Bonilla Mauricio, 507 Borda Miguel Germán, s1-57 Botero Javier E., 516 Botero Miguel, 79 Briceño Ignacio, 548

Brochero Helena Luisa, s2-124, s2-180,

s2-201

Buelvas Lina Patricia, 250 Buitrago Giancarlo, 353 Bustos Ingrid Gissel, 466 Bustos José, s1-20

Bustos-Vázquez Eduardo, s1-92

Cabanzo Wilson, s2-41 Cabello Águeda, 158 Cabezas Laura, s2-41, s2-193 Cabrera Olga Lucía, s2-15 Cáceres Abraham G., s2-167 Cáceres-Rey Omar, s-208 Cagnolo Susana Raquel, s2-67 Caicedo Diana María, s2-59 Caicedo Diana, 341

Calderón María Angélica, 131, s2-193

Calvopiña Karina, 233 Camacho Alejandro D., s-224 Camelo Nathalia, 466 Campo Omer, 486 Cano-Gutiérrez Carlos, s1-57

Carranza Julio César, s2-167 Carrasquilla Gabriel, 34, s2-180 Carrasquilla María de los Ángeles, 397

Carreño Aurora L., s2-50 Carvajal Carlos, 53 Casas María Consuelo, 22

Casas-Vargas Andrea, 548 Cassiani-Miranda Carlos Arturo, s1-112

Castañeda Laura, 62

Castañeda-Porras Oneida, 218 Castaño Carlos Felipe, s1-86

Castaño Martha, 416

Castaño Sandra, s2-135 s2-155 Castellanos Jaime Eduardo, 131, s2-193

Castellar Anaís, s1-75 Castillo Gilberto, 516 Castro Claudia, 86 Castro-Cardozo Betsy, 353 Caycedo Alexandra, 507 Comité Editorial, s2-12 Contreras Adolfo, 516

Contreras María Angélica, s-215

Coronel-Ruiz Carolina, s2-193 Correa Luis Alfonso, Correa Margarita M., s2-98 Correa-Núñez Germán H., s-208 Cortés Jorge Alberto, 79, 104, 353 Cortés Sebastián, s2-180 Covarrubias Karen, s2-77 Cruz Adriana, 416

Cuadros Juliana, s2-50 Cuartas Daniel Elías, s2-59 Chacón-Duque Juan Camilo, 486 Chaparro-Olaya Jacqueline, 131

Dadán Silvana, 315 Dadé Martín, 324 Dávila Fabián Antonio, 466 Dávila Lorena, 111

Dávila Victoria, 303 Daza Wilson, 315 De Assis Dalva. 158

De Assis Dalva, 158 De las Salas Roxana, s1-33 del Rosario Herrera Andrea, 498 Delgado Ligia Victoria, s1-12 Díaz Airleth Sofía, s-201 Díaz Francisco J., s1-75

Diaz Francisco J., s1-75
Díaz Lizbeth, s2-77
Díaz Sara Lucía, 498
Díaz-Agudelo Daniela, s1-33
Domínguez Vanihamín, 571
Donado Jorge Hernando, s1-86

Duarte Carolina, 390, 473 Duque Jonny E., s2-50

Echandía Carlos, s1-51 Echeverría Gustavo, s2-83 Echeverri-Toro Lina María, 62 Echeverry Ghisliane, 341 Echeverry María Clara, 538 Egea Eduardo, 260 Enríquez Sandra, s2-83 Ercilla Guadalupe, 184

Escandón-Vargas Kevin, 299 Escobar-Pérez Javier Antonio, 353 Esteban Lyda, 42, 68

Fachin Luis A., s2-167 Fang Luis, 260

Fernández Carlos M., 425, 452

Fernández Hugo, 516

Fernández-Niño Julián Alfredo, 368, s1-92

Ferrer Elizabeth, s1-66 Figueroa Roger, 341 Flórez Astrid Carolina, 361 Flórez Mónica, 68 Franco Diana L., 8 Franco Sergio, s1-12 Franky Mabel Patricia, 498 Galaviz-Silva Lucio, 333

Galaviz-Silva Lucio, 333
Galeano Rosa, 158
Gallego Sara, 516
Garavito Gloria, 260
Garcés Jhonny, s2-59
Garcés Juan Pablo, 416
García Diana, s2-180
García Liliana Torcoroma, 200
García Maylen, 425
García-de Viedma Darío, 233

Garzón Ruth, 119 Giraldo Natalia, s1-12 Girón-Callejas Amalia, 460 Gómez Alberto, 22, 548

Gómez Luis Alberto, s1-121 Gómez Natalia, 368 Gómez Verónica Jhajaira, 397 Gómez-Palacio Andrés, s2-135 Gonzales Lizandro, s2-167 González Javier Mauricio, 303 González Luis, 111 González Luz, 260 González María Nilse, 473 González Nubia, 498 González Ranulfo, s2-124

González-Jurado José Antonio, 408 González-Uribe Catalina, s-201

Grijalva Marcelo, 233

Group of Implementation of Fluorescence

Microscopy, 164

Gualtero Sandra Milena, 466 Guarnizo Pilar, 260 Guerra Beatriz Elena, 200 Guevara Marco, s1-75 Guna Remedios, 233 Gunia Alba, 164

Guzmán Miguel A., 290, 295

Henao Enrique, s2-155

Herazo-Bustos Mariana Isabel, s1-112 Hernández Javier Augusto, 444 Hernández John Camilo, s1-86 Hernández José Mauricio, 397 Hernández Juan Carlos, s1-121 Hernández Olga Helena, s1-12 Hernández-Carrillo Mauricio, s1-112

Herrera Andrea, 361 Herrera Diana, 233 Herrera Mónica Tatiana, 11 Hidalgo Andrea Melissa, 473 Hidrón Alicia, 62

Higuera Michelle, 315 Huiza Alina, s2-167 Iglesias Antonio, 260

Illnait-Zaragozí María Teresa, 425

Imaz María, 164 Jaimes Fabián, 53

Illnait María T., 452

Jaramillo Juan Felipe, 526, s2-41

Jaramillo Nicolás, 274

Jerez Elsy, 111 Jiménez Mónica Marcela, 34 Jiménez Patricia, 233 José Diego Fernando, 466 Jurado Leonardo F., s1-10 Kouznetsov Vladimir V., s2-50

Lara Camilo Andrés, 444 Lardón Marita, s1-104 Leal Aura Lucía, 353 Levis Silvana, s1-75 Licón Ángel, s2-77 Lizarazo Fredy Eberto, s2-27

Londoño Andrés F., s1-75 Lopera Mónica María, 577 López Guillermo, 260 López Myriam Consuelo, 368

López Ronald, s2-15

López-Casas Juan Gonzalo, 145

López-Quiroga Ángela Johana, 218

López-Rubio Andrés, s2-143 Luna Liany Johanna, 200 Luna-Caipo Deysi, s2-167 Llerena Claudia, 28, 86, 96

Machado-Alba Jorge Enrique, s1-43 Machado-Duque Manuel Enrique, s1-43

Madrid Camilo Alberto, 303 Malagón Clara, 260 Marín Johana, 538 Marín Jorge Alonso, 150 Marín-Cuero Darly, s1-51 Martínez Axel, 460 Martínez Genny, s2-59 Martínez Gerardo F., 452 Martínez José Alejandro, s2-77 Martínez Máncel, 507

Matiz María Inés, s2-41, s2-193

Medina Jhon, s1-20 Medina Raquel, 28 Mejía Ana María, 538, s2-155

Mejía-Villatoro Carlos, 460 Méndez César, 498 Méndez Fabián, 341, s2-59 Mendigaña Fernando Antonio, s2-27 Mendizábal-Burastero Ricardo, 460 Mendoza-Urbano Diana, s1-51

Mestorino Nora, 324 Millán Beatriz, 209 Mojica Julián, s1-20 Molina Jorge Alberto, s2-7 Molina-Garza Zinnia J., 333 Montes José Mauricio, 42 Montesino Ana Milena, s2-187 Montoya Carolina, s2-98 Montoya Gladis, s1-121 Morales Liliana, 131 Moreno Freddy, 516 Moreno Jaime, 390 Moreno Leticia, 571 Moreno Sandra, 516 Moreno Yaneth, s2-77 Morocoima Antonio, s1-66

Muñoz-Zuluaga Carlos A., 299 Murcia Martha, 96 Murillo Olga Lucía, s2-27

Muskus Carlos Enrique, 378, 538

Narbona Eduardo, s1-104 Navarro Juan Carlos, s2-83

Nevárez-Moorillón Guadalupe Virginia, s-224 Nocua-Báez Laura Cristina, 353

Nogueda-Torres Benjamín, s-224 Ocampos Sandra, 158 Ojeda Andrea, 158

Olano Víctor Alberto, s2-41, s2-193

Olaya Patricia, 22 Olivieri Rommy, s1-20 Olmos Carlos, 260

Ondo-Méndez Alejandro, 119 Orobio Sandra, s1-51 Orobio Yenifer, 416

Orozco Luz Yaneth, 378 Ortega Mayra Alexandra, 150

Ortega Óscar, 119 Ortiz Claudia Cristina, 11 Ortiz Johan, s1-20

Osorio Edelmiro Santiago, 571 Osorio-Arango Karime, 175, 184 Ospina-Martínez Martha Lucía, 441

Ospina Sigifredo, 62 Ovalle María Victoria, 473

Ovalle-Guerrero María Victoria, 353

Overgaard Hans J., s2-41

Pabón Adriana, 378 Pacheco Carlos, 53

Pacheco José Armando, 150 Pacheco Miguel Alfonso, s2-124

Pacheco Óscar, 507 Pachón Edwin, s2-27 Padilla Carlos P., s2-167 Padilla Julio César, s2-7, s2-27

Padrón Karla, 111

Palacios Paola Andrea, 390 Palomino-Devia Constanza, 408 Pardo Raúl, s2-7, s2-15 Pardo-Turriago Rodrigo, s1-5 Pareja María José, 466

Parra Beatriz, 516 Parra José Hernán, 526

Parra-Henao Gabriel, 274, s2-106 Patiño-Restrepo José Félix, 5 Pedrozo María Esther, 158 Penagos Sara, 62 Peña Miguel, 341, s2-59 Pérez María Alejandra, 444

Pérez-Aníbal Eduard, s1-112 Pérez-Barrera Jorge, s2-83 Pérez-Doria Alveiro, s2-187 Pérez-Lago Laura, 233 Pérez-Pérez Juliana, s2-155 Perurena Mayda R., 452 Poggi Susana, 164

Porter Charles, s2-143, s-215 Poveda Ana, s2-83 Prieto Franklyn, 175

Puerto Gloria, 86 Quintero Juliana, s2-180 Quiroga Andrés Javier, 191 Quirós-Gómez Óscar, 274 Ramírez Carolina, 561 Ramírez Faiver, 62

Ramírez María del Pilar. 22 Ramírez Ruth, 486

Ramos-Parraci Carlos Alberto, 408

Restrepo Berta Nelly, 486 Restrepo Carlos, 62 Restrepo Carolina, s2-155 Restrepo Catalina, 303 Restrepo Cristian Andrés, 368

Reves Marlene, 68 Reyes Patricia, 368

Reyes-Montaño Édgar Antonio, 238

Reyes-Ortiz Carlos, s1-57

Ricardo Alba, 86

Rincón-Cortés Clara Andrea, 238 Rivera Hernán Mauricio, s1-121

Robayo Adriana, 175 Robledo Jaime, 397 Rodas Juan D., s1-75 Rodríguez Gerzaín, 147, 286

Rodríguez José Vicente, 548 Rodríguez-Figueroa Laura, s2-106 Rodríguez-Vega Federico, 79 Rodríguez-Zabala Julián, s2-98 Rojas Carlos, 233 Rojas Christian, s1-51 Rojas Winston, 486 Rojas-Jaimes Jesús E., s-208 Roias-Palomino Nyshon, s-208 Rojo Raúl, s2-155 Romero Liza M., 548 Romero Vanessa, s2-83 Roncancio-Villamil Gustavo, 303 Rúa-Uribe Guillermo L., s2-155 Rubiano Luisa Consuelo, 416 Rueda Natalia, 444 Ruelas-Llerena Nancy, s2-167 Rugeles María T., 267 Ruiz Miguel Ángel, 368

Saavedra Sandra Yamile, 353, 473 Salazar Ángela Skantria, 368 Salazar Liliana, 299 Salmen Siham, 111 Samper-Ternent Rafael, s1-57 San Juan Javier L., 452 Sanabria Olga, 390 Sanabria William H., s2-155 Sánchez Isaura Pilar, 150 Sánchez Ricardo, 104 Sánchez Sunny, 425 Sánchez Susi Daniela, 466 Sánchez Yasmin, s1-20 Sánchez-Torres Luvia E., s-224 Santa Fernando, s2-41 Santos Óscar, 22 Sarmiento Diana, s2-41

Segura Laura María, 368

Sierra-Torres Carlos H., 191 Silva Edwin, 466 Silva Margarita, 548 Simancas-Pallares Miguel, 308 Solórzano Eduvigis, 111 Sotelo Aura Isabel, s-201 Stenstrom Thor-Axel, s2-41 Suárez Marcial, s2-167 Suárez Marco F., s2-15 Suaza Juan D., s2-143, s-215 Suaza-Vasco Juan, s2-135 Tabares Juan Hember, 368 Thomas Leslie, 8 Tobón Ángela, 79 Tobón-Castaño Alberto, 590 Togneri Ana, 164 Toquero Manuel, s1-66 Toro-González Gabriel, s1-9 Torres Ángela, 68 Torres Beatriz, 571 Torres Isabel Cristina, 466 Torres Moisés Ulises, s1-12 Torres Rodrigo Gonzalo, 11 Torres-Muñoz Javier, s1-51 Torres-Torres Fernando, 218 Trespalacios Alba Alicia, 191 Triana Omar, 538, s2-135, s2-155 Tuñoque José R., s2-167 Uberos José, s1-104

Ulvedal Carolina, s2-67 Uribe Carlos Santiago, s1-26 Uribe Luis Guillermo, 444 Uribe Sandra, s2-135, s2-143, s-215 Urrea Daniel, 538 Urueña Piedad, s1-12 Usaquén William, 548

Valbuena Angélica, 96 Valbuena Tania, 507 Valderrama Eliana, 62 Vallejo Gustavo Adolfo, s2-167 Varela Yasmin, 209 Vargas Sandra, s2-41 Vargas Sergio Alberto, s1-26 Vargas-Hernández María Camila, s1-112 Vásquez Daniel, 516 Vega Jorge A., 267 Vega-Castro Nohora Angélica, 238 Velandia Myriam L., 131, s2-193 Velar Rosario E., 452 Velasco Harvy Mauricio, 250 Velasco Tania Katherine, 200 Vélez Iván Darío, s2-143, s-215 Ventura Gladis, s2-167 Vera Mauricio Javier, s2-27 Verbel-Vergara Daniel, s2-187 Vergara José Gabriel, s2-187 Villa Pablo, 62 Villegas-Ospina Simón, 267 Vivero Rafael J., s-215 Vizcaíno Viviana, 22 Warburg Alon, s2-83 Wilches Myriam Rocío, 498 Wolff Lidia, 164 Yax Elizabeth, 460 Zabaleta Angie, 86, 96, 507 Zambrano Dolores, 425 Zambrano Luis Carlos, 466 Zapata Carlos Hugo, s1-26 Zapata Wildeman, 267

Zapata-Castañeda Kevin, s1-43 Zea Sara, 548 Zuleta-Dueñas Liliana Patricia, 218 Zuluaga Liliana María, s1-86

# Biomédica

# INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Volumen 37, números 1, 2, 3, 4, suplementos 1 y 2

# Índice de artículos

#### **Editorial**

-l Instituto Nacional de Salud, una institución paradigmática	
La donación y el trasplante de componentes anatómicos en Colombia: siete décadas de logros	
nfecciones de transmisión sexual, un reto permanente y en constante aumento	
Un siglo del Instituto Nacional de Salud y una proyección para los próximos años	
Neuropatías tropicales, un lastre del subdesarrollo y un reto en un mundo globalizado	
Manejo integrado de los riesgos ambientales y el control de vectores: una nueva propuesta para la prevención sostenible y el control oportuno de las enfermedades transmitidas por vectores	
Nota editorial	
Biomédica en Publindex, 15 de septiembre de 2017 a septiembre de 2018	S
Haga usted el diagnóstico	
Hombre de 66 años con nódulos exulcerados del codo de cuatro años de evolución, primera parte	
Hombre de 66 años con nódulos exulcerados del codo de cuatro años de evolución, segunda parte	
mágenes en biomedicina	
Alimentación de <i>Rhodnius prolixus</i>	
Neurocisticercosis	
Jna enfermedad antigua, pero no del pasado: paraplejia de Pott en un profesional de la salud positivo para HIV	
nsectos vectores de agentes infecciosos	
Presentación de caso	
Cáncer de pulmón de células pequeñas asociado a múltiples síndromes paraneoplásicos	
Síndrome de hipersensibilidad a medicamentos con exantema, eosinofilia y síntomas sistémicos inducido	
oor carbamazepina	
Casos de intoxicación aguda por plaguicidas en la colonia Puerto Pirapó, Itapúa, Paraguay, febrero de 2014	
Foxoplasmosis diseminada en un paciente con trasplante de corazón a pesar de la profilaxis con trimetoprim-sulfametoxazol	
Presentación del síndrome de Wernicke-Korsakoff secundario a encefalitis por citomegalovirus,	
a propósito de un caso	
Síndrome de encefalopatía posterior reversible: reporte de un caso fatal y análisis de factores predictores	
de mal pronóstico	5
Encefalitis autoinmunitaria asociada a anticuerpos contra el receptor N-metil-D-aspartato: presentación de dos casos	,
Neurocisticercosis racemosa (sic), diagnóstico por neuroimágenes	
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	
Genotipos circulantes del virus de la hepatitis C en Colombia	
Descripción de las mutaciones de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> que confieren resistencia a rifampicina e isoniacida detectadas mediante GenoType® MTBDRplus V.2 en Colombia	
Seroprevalencia de la infección por dengue en los municipios de Armenia, Calarcá, La Tebaida y Montenegro en el departamento del Quindío, 2014	
Diversidad de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) en Santander, Colombia: implicaciones epidemiológicas	
Perfil clínico y demográfico y factores de riesgo frente a la infección por <i>Clostridium difficile</i>	

Características sociodemográficas y clínicas de pacientes con infección por <i>Leptospira</i> spp. atendidos en cuatro centros hospitalarios de Medellín, Colombia, 2008-2013	
Riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas por intrusión de triatominos y mamíferos silvestres en Bucaramanga, Santander, Colombia	
Hallazgos patológicos en adenopatías de pacientes con infección por HIV	
Caracterización de aislamientos clínicos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> obtenidos de individuos positivos para HIV en Colombia, 2012	
Prevalencia de la resistencia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a quinolonas y fármacos inyectables en Colombia, 2012-2013	
Adaptación transcultural del cuestionario de puntuación de la neumonía adquirida en la comunidad en pacientes con neumonía leve a moderada en Colombia	
Aloinjertos análogos de mucosa bucal en ratas no consanguíneas	
Activación de STAT3 por hipoxia en modelos in vitro de cáncer de cuello uterino y en células endoteliales	
Rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED para la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes en muestras respiratorias en laboratorios periféricos de Argentina	
Supervivencia de receptores de trasplante renal en Colombia, 2008-2012	
Determinación del polimorfismo de HLA-A, -B y -DRB1 en donantes de órganos con muerte encefálica representativos de la población general colombiana, 2007-2014	
Frecuencia de mutaciones de la nitrorreductasa RdxA de <i>Helicobacter pylori</i> para la activación del metronidazol en una población del departamento del Cauca, Colombia	
Nueva reacción en cadena de la polimerasa múltiple para el diagnóstico específico de especies implicadas en la candidiasis humana	
Diversidad genética de cepas extraintestinales de <i>Escherichia coli</i> productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención en salud	
Posible transmisión oral de la enfermedad de Chagas en trabajadores del sector de los hidrocarburos en Casanare, Colombia, 2014	
Detección de Mycobacterium tuberculosis, linaje Beijing, en Ecuador	
Purificación parcial de péptidos presentes en el veneno del escorpión <i>Tityus macrochirus</i> (Buthidae) y evaluación preliminar de su actividad citotóxica	
Caracterización de pacientes con enfermedades genéticas del esqueleto en un centro colombiano de remisión	
Validez de constructo y consistencia interna de tres estructuras factoriales y dos sistemas de puntuación del cuestionario de salud general de 12 ítems	
Perfil de las enfermedades gastrointestinales en un centro de gastroenterología pediátrica en Colombia: 15 años de seguimiento	
Evaluación del efecto tóxico de la doramectina, la ivermectina y la eprinomectina sobre  Triatoma infestans en un modelo de rata	
Pediculus capitis en niños de escuelas de la zona urbana de Nuevo León, México: análisis de factores asociados	
Condición socioeconómica, patrones de alimentación y exposición a metales pesados en mujeres en edad fértil de Cali, Colombia	
Perfil de sensibilidad antimicrobiana de microorganismos causantes de infecciones urinarias adquiridas en la comunidad en pacientes con diabetes mellitus en Colombia	
Detección de anticuerpos contra Trypanosoma cruzi en pacientes multitransfundidos, Colombia	
Perfiles de poliparasitismo intestinal en una comunidad de la Amazonia colombiana	
Efecto mutagénico y genotóxico, y expresión de los genes Rad51C, Xiap, P53 y Nrf2 inducidos por extractos antipalúdicos de plantas recolectadas en el Vaupés medio, Colombia	
Caracterización molecular de los serotipos no vacunales 11A, 15 B/C y 23A de Streptococcus pneumoniae recuperados de aislamientos invasivos en Colombia	
Precisión diagnóstica de tres pruebas moleculares para detectar la tuberculosis multirresistente	
Composición corporal y condición física de escolares colombianos de educación secundaria y media de Ibagué	
La educación del personal de salud: clave para la eliminación de la sífilis congénita en Colombia	
Sensibilidad in vitro de cepas cubanas de Aspergillus spp. de origen clínico y ambiental	
Ontimización de recursos para determinar la carga viral de HIV-1 en un país con pocos recursos	

Características de la infección por <i>Clostridium difficile</i> en una institución de alta complejidad y reporte de la circulación en Colombia de la cepa hipervirulenta NAP1/027	466
Resultados de la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud, Colombia, 2012-2014	473
Variantes en los genes TNFA, IL6 e IFNG asociadas con la gravedad del dengue en una muestra de población colombiana	486
Valoración mediante espirometría de mineros del carbón de Paipa, Colombia	. 498
Estimación del subregistro de casos de enfermedad por el virus del chikungunya en Girardot, Colombia, noviembre de 2014 a mayo de 2015	507
Microbiota periodontal y microorganismos aislados de válvulas cardiacas en pacientes sometidos a cirugía de reemplazo de válvulas en una clínica de Cali, Colombia	516
Cómo intervenir y prevenir el retraso del crecimiento en niños menores de cinco años de hogares incluidos en el Sisbén de Caldas	. 526
Curvas de fusión de regiones genómicas específicas: una herramienta prometedora para el diagnóstico y tipificación de las especies causantes de la leishmaniasis cutánea en Colombia	538
Diversidad del ADN mitocondrial en restos óseos prehispánicos asociados al Templo del Sol en los Andes orientales colombianos	548
Reacciones adversas a medicamentos en neonatos hospitalizados en unidades de cuidado intensivo neonatal en Barranquilla, Colombia	s1-33
Perfil de utilización del carbonato de litio en pacientes con trastorno afectivo bipolar en 25 ciudades de Colombia	s1-43
Factores de riesgo asociados con el desarrollo de asfixia perinatal en neonatos en el Hospital Universitario del Valle, Cali, Colombia, 2010-2011	. s1-5
Evaluación de factores asociados al estado funcional en ancianos de 60 años o más en Bogotá, Colombia	s1-57
Seroprevalencia y factores de riesgo de cisticercosis en dos comunidades rurales del norte del estado Anzoátegui, Venezuela	. s1-66
Primera evidencia de infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica (arenavirus) en roedores Mus musculus capturados en la zona urbana del municipio de Sincelejo, Sucre, Colombia	s1-75
Efecto del tratamiento prenatal con espiramicina en la frecuencia de retinocoroiditis por toxoplasmosis congénita en una cohorte colombiana	s1-86
Autopercepción de la salud, presencia de comorbilidades y depresión en adultos mayores mexicanos: propuesta y validación de un marco conceptual simple	s1-92
¿Afecta el tratamiento con corticoides en los periodos prenatal y posnatal el neurodesarrollo del recién nacido prematuro?	s1-104
Confiabilidad y dimensión del cuestionario de salud del paciente (PHQ-9) para la detección de síntomas de depresión en estudiantes de ciencias de la salud en Cartagena, 2014	s1-112
Características de la estructura molecular de las proteínas E del virus del Zika y E1 del virus de la rubéola y posibles implicaciones en el neurotropismo y en las alteraciones del sistema nervioso	s1-12 <sup>1</sup>
Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016	s2-27
Distribución espacial de <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae) en el área rural de dos municipios de Cundinamarca, Colombia	s2-41
Acción insecticida de análogos sintéticos de girgensohnina y de aceites esenciales sobre Rhodnius prolixus (Hemiptera: Reduviidae)	s2-50
Distribución espacial de criaderos positivos y potenciales de Aedes aegypti	s2-59
Ensayos de sensibilidad de larvas de Aedes aegypti y Culex quinquefasciatus frente al nematodo Heterorhabditis bacteriophora en condiciones de laboratorio	s2-67
Parámetros biológicos de <i>Meccus phyllosomus phyllosomus</i> (Burmeister) 1835, de <i>Triatoma recurva</i> (Stål) 1868 (Hemiptera, Reduviidae) y de sus híbridos de laboratorio	s2-77
Aspectos ecoepidemiológicos, detección natural e identificación molecular de <i>Leishmania</i> spp. en <i>Lutzomyia reburra</i> , <i>Lutzomyia barrettoi majuscula</i> y <i>Lutzomyia trapidoi</i>	s2-83
Abundancia, composición e infección natural de mosquitos <i>Anopheles</i> en dos regiones endémicas para malaria en Colombia	s2-98
Análisis espacio-temporal de las condiciones biofísicas y ecológicas de <i>Triatoma dimidiata</i> (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) en la región nororiental de los Andes de Colombia	. s2-106

Anopheles darlingi Root 1926 (Diptera: Culicidae): variaciones morfométricas en alas y patas de poblaciones de Colombia	s2-124
Infección de Aedes albopictus (Skuse, 1894) con el genotipo asiático-americano del virus del dengue serotipo 2 en Medellín y su posible papel como vector del dengue en Colombia	s2-135
Señal filogenética de la región Cytb-SertRNA-IG1-ND1 en <i>Anophel</i> es (Kerteszia) <i>neivai</i> Howard, Dyar & Knab, 1913	s2-143
Vigilancia virológica de <i>Aed</i> es (Stegomyia) <i>aegypti</i> y <i>Aede</i> s (Stegomyia) <i>albopictu</i> s como apoyo para la adopción de decisiones en el control del dengue en Medellín	s2-155
Detección de unidades discretas de tipificación de <i>Trypanosoma cruzi</i> en triatominos recolectados en diferentes regiones naturales de Perú	s2-167
Efecto del tipo y del número de lavados en la eficacia de mosquiteros tratados con deltametrina de larga duración para el control de <i>Aedes aegypti</i> en Girardot, Colombia	s2-180
Comunicación breve	
Asociación de variantes polimorfas de los genes PTPN22, TNF y VDR en niños con nefritis lúpica: un estudio de tríos en familias colombianas	260
Los haplotipos en CCR5-CCR2, CCL3 y CCL5 se asocian con resistencia natural a la infección por el HIV-1 en una cohorte colombiana	267
Caracterización molecular de los aislamientos de <i>Cryptococcus neoformans</i> de pacientes con HIV, Guayaquil, Ecuador	425
Estimación del tiempo límite de detección del gen citocromo b de humanos en hembras de Lutzomyia evansi	s2-187
Detección del virus del dengue en larvas y pupas de <i>Aedes aegypti</i> recolectadas en áreas rurales del municipio de Anapoima, Cundinamarca, Colombia	s2-193
Bionomía de <i>Anopheles</i> (Nyssorhynchus) <i>albimanus</i> (Diptera: Culicidae) en dos rancherías del pueblo wayúu, Riohacha, La Guajira, Colombia	s2-20
Detección de <i>Leishmania</i> (V) <i>guyanensis</i> en ejemplares de <i>Rhipicephalus</i> (Boophilus) <i>microplus</i> (Acari: Ixodidae) recolectados en pecaríes de collar ( <i>Pecari tajacu</i> )	s2-208
Especies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) recolectados en reservas naturales de las regiones del Darién y del Pacífico en Colombia	s2-215
Actualización	
Revisión comentada de la legislación colombiana en ética de la investigación en salud	577
Revisión de tema	
Triatoma dimidiata en Colombia; distribución, ecología e importancia epidemiológica	274
El análisis de orina como herramienta diagnóstica en casos de malaria grave	590
Aceites esenciales y sus componentes como una alternativa en el control de mosquitos vectores de enfermedades	s2-224
Nota técnica	
Anticuerpos policionales contra la proteína recombinante NS3 del virus del dengue	13
Validación de una metodología analítica para determinar bifenilos policlorados en muestras de plasma sanguíneo	56 <sup>-</sup>
El caseinato de sodio incrementa el número de linfocitos B en ratones.	57
Comentarios bibliográficos	
"Las leishmaniasis: atlas y texto"	290
Cartae al editor	13,

# Biomédica

# INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Volume 37, numbers 1, 2, 3, 4, supplements 1 and 2

# Articles' index

# Editorial

The Instituto Nacional de Salud, an emblematic institution	
Donation and transplantation of anatomical components in Colombia: Seven decades of achievements	
Sexually transmitted infections, a permanent challenge on the rise	2
One hundredth anniversary of the <i>Instituto Nacional de Salud</i> , perspectives for the comming years	
Tropical neuropathies, a burden of underdevelopment and a challange in a global world	s
Integrated management of environmental risks and vector control: A new proposal of sustainable prevention and timely control of vector-bourne diseases	s
Editorial note	
Biomédica in Publindex, from September 15, 2017 to September 2018	s2
Make your own diagnosis	
A 66-year old man with exulcerated nodules on his left elbow of four years of evolution, part one	
A 66-year old man with exulcerated nodules on his left elbow of four years of evolution, part two	
Images in biomedicine	
Blood-feeding of Rhodnius prolixus	
Neurocysticercosis	
Ancient disease, but not a thing of the past: Pott's paraplegia in an HIV-positive health-care worker	
Vector insects of infectious agents	
· ·	
Case presentation	
Small cell lung cancer associated with multiple paraneoplastic syndromes	
Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms syndrome induced by carbamazepine: Case report	
Disseminated toxoplasmosis in a heart transplant patient despite co-trimoxazole prophylaxis: A case report	
Posterior reversible encephalopathy syndrome: Report of a fatal case and analysis of predictive factors	
of a poor prognosis	s
Autoimmune encephalitis associated to antibodies against the N-methyl-D-aspartate receptor:  Report of two cases	
Racemose neurocysticercosis: Neuroimaging guides the diagnosis	
Original articles	
Synthesis of antibiotic loaded polylactic acid nanoparticles and their antibacterial activity against  Escherichia coli O157:H7 and methicillin-resistant Staphylococcus aureus	
Hepatitis C virus genotypes circulating in Colombia	
Description of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mutations conferring resistance to rifampicin and isoniazid detected by GenoType® MTBDRplus V.2 in Colombia	
Seroprevalence of dengue infection in the municipalities of Armenia, Calarcá, La Tebaida and Montenegro in Quindío, 2014	
Diversity of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Santander, Colombia: Epidemiological implications	
Clinical and demographic profile and risk factors for <i>Clostridium difficile</i> infection	
Sociodemographic and clinical characteristics of patients infected with <i>Leptospira</i> spp. treated at four hospitals in Medellín, Colombia, 2008-2013	
Risk of transmission of Chagas disease by intrusion of triatomines and wild mammals in Bucaramanga,	
Santander, Colombia	

Pathological findings in patients with HIV infection and lymphadenopathies
Characterization of clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from HIV positive individuals in Colombia, 2012
Prevalence of Mycobacterium tuberculosis resistance to quinolones and injectables in Colombia, 2012-2013
Cross-cultural adaptation of the community-acquired pneumonia score questionnaire in patients with mild-to-moderate pneumonia in Colombia
Oral mucosa analog allografts in non-consanguineous rats
STAT3 activation by hypoxia in in vitro models of cervix cancer and endothelial cells
Performance of LED fluorescence microscopy for the detection of acid-fast bacilli from respiratory samples in peripheral laboratories in Argentina
Survival in renal transplant recipients in Colombia, 2008-2012
Determination of HLA-A, -B and -DRB1 polymorphism in brain dead organ donors representative of the Colombian general population, 2007-2014
Frequency of <i>Helicobacter pylori</i> nitroreductase RdxA mutations for metronidazole activation in a population in the Cauca Department, Colombia
A new multiplex PCR for species-specific diagnosis of human candidiasis
Genetic diversity of extraintestinal <i>Escherichia</i> coli strains producers of beta-lactamases TEM, SHV and CTX-M associated with healthcare
Possible oral transmission of Chagas' disease among hydrocarbons sector workers in Casanare, Colombia, 2014
dentification of the <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Beijing lineage in Ecuador
Partial purification of peptides present in the <i>Tityus macrochirus</i> (Buthidae) scorpion venom and preliminary assessment of their cytotoxicity
Characterization of patients with skeletal genetic diseases in a Colombian referral center
Construct validity and internal consistency of three factor structures and two scoring methods of the 12-item  General Health Questionnaire
Profile of gastrointestinal diseases in a pediatric gastroenterology center in Colombia: 15 years of follow-up
Evaluation of the toxic effects of doramectin, ivermectin and eprinomectin against <i>Triatoma infestans</i> using a rat model
Pediculus capitis in schoolchildren of the urban area of Nuevo León, México: Analyses of associated factors
Socioeconomic status, eating patterns, and heavy metals exposure in women of childbearing age in Cali, Colombia
Antimicrobial susceptibility profile in urinary pathogens causing community-acquired infections in diabetic patients in Colombia
Detection of Trypanosoma cruzi antibodies in multitransfused patients in Colombia
Profiles of intestinal polyparasitism in a community of the Colombian Amazon region
Mutagenicity, genotoxicity and gene expression of Rad51C, Xiap, P53 and Nrf2 induced by antimalarial extracts of plants collected from the middle Vaupés region, Colombia
Molecular characterization of non-vaccine Streptococcus pneumoniae serotypes 11A, 15 B/C and 23A recovered from invasive isolates in Colombia
Diagnostic accuracy of three technologies for the diagnosis of multi-drug resistant tuberculosis
Body composition and physical fitness in Colombian high school students from Ibagué
Educating health workers is key in congenital syphilis elimination in Colombia
In vitro susceptibility of Cuban Aspergillus spp. strains of clinical and environmental origin
Optimizing resources to reduce costs to determine HIV viral load in limited resources settings
Characteristics of Clostridium difficile infection in a high complexity hospital and report of the circulation of the NAP1/027 hypervirulent strain in Colombia
Results of the national surveillance of antimicrobial resistance of Enterobacteriaceae and Gram negative bacilli in health care-associated infections in Colombia, 2012-2014
Variants in the TNFA, IL6 and IFNG genes associated with dengue severity in a sample of Colombian population
Spirometry in a population of coal miners in Paipa, Colombia

Estimation of underreporting of Chikungunya virus infection cases in Girardot, Colombia, from November, 2014, to May, 2015	50
Periodontal microbiota and microorganisms isolated from heart valves in patients undergoing valve replacement surgery in a clinic in Cali, Colombia	51
How to intervene and prevent stunting of children from homes belonging to the Sisbén in Caldas	52
High-resolution melting analysis based on specific genomic regions: A promising tool for the diagnosis and typing of species causing cutaneous leishmaniasis in Colombia	53
Mitochondrial DNA diversity in prehispanic bone remains on the eastern Colombian Andes	54
Adverse drug reactions in neonates hospitalized in neonatal intensive care units in Barranquilla, Colombia	s1-3
Profile of lithium carbonate use in patients with bipolar disorder in Colombia	s1-4
Risk factors associated with the development of perinatal asphyxia in neonates at the Hospital Universitario del Valle, Cali, Colombia, 2010-2011	s1-
Assessment of factors associated with functional status in 60 years-old and older adults in Bogotá, Colombia	s1-5
Seroprevalence and risk factors of cysticercosis in two rural communities in Anzoátegui state, Venezuela	s1-6
First evidence of lymphocytic choriomeningitis virus (Arenavirus) infection in <i>Mus musculus</i> rodents captured in the urban area of the municipality of Sincelejo, Sucre, Colombia	s1-7
Effect of antenatal spiramycin treatment on the frequency of retinochoroiditis due to congenital toxoplasmosis in a Colombian cohort	s1-8
Self-rated health, multimorbidity and depression in Mexican older adults: Proposal and evaluation of a simple conceptual model	s1-9
Does corticosteroid treatment during the pre and postnatal periods affect the neurodevelopmental outcome of premature newborns?	
Reliability and dimensionality of PHQ-9 in screening depression symptoms among health science students in Cartagena, 2014	
E-ZIKV and E1-RV proteins molecular structure and their potential implications in neurotropism and nervous system disorders	
Transmission scenarios of major vector-borne diseases in Colombia, 1990-2016	
Spatial distribution of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) in the rural area of two municipalities of Cundinamarca, Colombia	s2-4
Insecticidal action of synthetic girgensohnine analogues and essential oils on <i>Rhodnius prolixus</i> (Hemiptera: Reduviidae)	s2-5
Spatial distribution of potential and positive <i>Aedes aegypti</i> breeding sites	
Laboratory susceptibility tests of Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus larvae to the entomopathogenic nematode Heterorhabditis bacteriophora	
Biological parameters of <i>Meccus phyllosomus phyllosomus</i> (Burmeister), 1835, <i>Triatoma recurve</i> (Stål), 1868 (Hemiptera, Reduviidae) and their laboratory hybrids	
Eco-epidemiological aspects, natural detection and molecular identification of <i>Leishmania</i> spp. in <i>Lutzomyia reburra</i> , <i>Lutzomyia barrettoi majuscula</i> and <i>Lutzomyia trapidoi</i>	
Abundance, composition and natural infection of <i>Anopheles</i> mosquitoes from two malaria-endemic regions of Colombia	s2-9
Spatio-temporal analysis of the biophysical and ecological conditions of <i>Triatoma dimidiata</i> (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in the northeast region of Colombia	
Anopheles darlingi (Diptera: Culicidae) Root 1926: Morphometric variations in wings and legs of populations from Colombia	
Aedes albopictus (Skuse, 1894) infected with the American-Asian genotype of dengue type 2 virus in Medellín suggests its possible role as vector of dengue fever in Colombia	s2-13
Phylogenetic signal at the Cytb-SertRNA-IG1-ND1 mitochondrial region in <i>Anopheles</i> (Kerteszia) neivai Howard, Dyar & Knab, 1913	
Virological surveillance of <i>Aedes</i> (Stegomyia) <i>aegypti</i> and <i>Aedes</i> (Stegomyia) <i>albopictus</i> as support for decision making for dengue control in Medellín	
Identifying Trypanosoma cruzi discreet typing units in triatomines collected in different natural regions of Perú	

Effect of the type and number of washes in the efficacy of long lasting insecticidal nets for <i>Aedes aegypti</i> control in Girardot, Colombia	s2-180
Brief communication	
Association of polymorphic variants of PTPN22, TNF and VDR genes in children with lupus nephritis:  A study in Colombian family triads	260
Haplotypes in CCR5-CCR2, CCL3 and CCL5 are associated with natural resistance to HIV-1 infection in a Colombian cohort	267
Molecular characterization of Cryptococcus neoformans isolates from HIV patients, Guayaquil, Ecuador	425
Estimation of time detection limit for human cytochrome b in females of Lutzomyia evansi	s2-187
Dengue virus detection in <i>Aedes aegypti</i> larvae and pupae collected in rural areas of Anapoima, Cundinamarca, Colombia	s2-193
Bionomics of <i>Anopheles</i> (Nyssorhynchus) <i>albimanus</i> (Diptera: Culicidae) in two villages of the Wayúu people, Riohacha, La Guajira, Colombia	s2-201
Detection of <i>Leishmania</i> (V) <i>guyanensis</i> in <i>Rhipicephalus</i> (Boophilus) <i>microplus</i> (Acari: Ixodidae) collected from <i>Pecari tajacu</i>	s2-208
Species of sand flies (Diptera: Psychodidae) collected from natural reserves in the Pacific and Darien regions of Colombia	s2-215
Update	
Commented review of the Colombian legislation regarding the ethics of health research	577
Topic review	
Triatoma dimidiata in Colombia: Distribution, ecology and epidemiological importance	274
Urinalysis as a diagnostic tool in severe malaria	590
Essential oils and their components as an alternative in the control of mosquito vectors of disease	s2-224
Technical note	
Polyclonal antibodies against recombinant dengue virus NS3 protein	131
Validation of an analytical methodology to determine polychlorinated biphenyls in samples from blood plasma	56′
Sodium caseinate increases the number of B lymphocytes in mouse.	571
Book review	
"Las leishmaniasis: atlas y texto"	290
Latters to the aditor	424

# 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:

- 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%20 MEDICAMENTOS%20ACUERDO%20008%20 CRES.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.
- No se ha excluido de la lista de autores el nombre de ningún autor que reúna los requisitos para serlo.
- Todos los autores conocen la versión final del manuscrito sometido para publicación y están de acuerdo con ella.
- 5) No se ha incurrido en conducta alguna que pueda considerarse como transgresión de la integridad científica o de los principios éticos que rigen las publicaciones científicas.

# **BIOMÉDICA**

# Lista de verificación

Con el fin de comprobar que se hayan cumplido todas las instrucciones correspondientes a las normas de publicación de la revista *Biomédica*, le solicitamos que diligencie en línea la siguiente lista de verificación y la presente junto con su manuscrito.

Categoría		
Artículo original	Comunicación breve	Nota técnica
Revisión de tema	Reseña histórica	Ensayo
Comentario	Imágenes en biomedicina	
Presentación de caso	Haga usted el diagnóstico	
Carta al editor	Reseña bibliográfica	
1- Presentación		
Texto escrito a doble espaci	o en fuente Arial de 12 puntos de tamaño y	alineado a la izquierda
Páginas numeradas consec	utivamente en la esquina inferior derecha	
2- Título		
Se incluyen los títulos en es	pañol e inglés (máximo 165 caracteres).	
Se incluye el título abreviado	o en español, o inglés en los casos pertiner	ntes (máximo 50 caracteres).
Los autores aparecen sólo o	on su afiliación institucional, sin mencionar o	cargos ni títulos académicos.
El autor de la correspondence fax y dirección electrónica.	ia suministró los datos completos: nombre, a	apellidos, dirección, teléfono,
3- Resumen		
palabras y con los siguiente y conclusiones.	ructurado en español e inglés, con una es subtítulos: introducción, objetivos, matero se requiere para artículos originales y cor	riales y métodos, resultados
4- Palabras clave		
Se incluyen 6 a 10 por artíci	ulo en cada idioma.	
	en español e inglés indexadas en los Des vs.br/E/homepagee.html) y <i>Medical Subje</i> shhome.htm).	
5- Estructura del artículo origin	nal, nota técnica y comunicación breve	
Se incluyen los siguientes aparta	dos:	
Introducción		
Materiales y métodos		
Resultados		
Discusión		
Agradecimientos		
Declaración de conflicto de	ntereses	

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 <i>Biomédica</i> 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:

- Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work;
- drafting the work or revising it critically for important intellectual content;
- final approval of the version to be published, and
- 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:

- 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 Aria	al font size 12 point, on one side of le	etter-size pages
Pages numbered consecutively		
2. Title		
Title in Spanish and English (maxin	num 165 characters)	
Running title in the same language 50 characters)	used in the text of the manuscript (	Spanish or English, maximum
Authors' names with institutional af	filiations (do not include current posi	itions or academic titles)
Corresponding author's information:	name, postal address, phone number	er, fax number, e-mail address
3. Abstracts		
Introduction, Objective(s), Materi	h and English (maximum 250 words als and methods, Results, Concl original articles and short communi	usion(s). The inclusion of a
4. Keywords		
6 to 10 per manuscript in each lang	juage	
available from http://www.nlm.nih	erified in the Medical Subject Headir .gov/mesh7meshhome.htm, and S <i>lud (DeCS)</i> of the Latin American an s.br	Spanish keywords verified in
5. Structure of an original article, tec	hnical note or short communicati	on
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 s	pace
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 ter	xt.
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 p Avoid using abbreviations and acronyms that are not universally accepted.	arenthesis.
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 tas in the title and in the abstracts; after, just use the first letter of the genus followed by a complete name of the species.	
12. General considerations	
Printed letter of submission signed by all authors. In the case of authors living abroad should be signed, scanned and sent from their personal e-mails.	d, the letter
Conflicts of interest statement in the corresponding form filled out by each author.	
Manuscripts presenting results from research conducted on human subjects or animals explicit statement that ethical clearance was requested and obtained from an institutional mittee. 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 fully aware of this and agree to their inclusion.	section are
The financial support statement was included.	
The names, institutional affiliation and e-mails of the four national and four international suggested by the authors were included in the letter of submission.	I reviewers