I-ISSN 2590-7379 (En línea)

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 38, Suplemento No. 2, Medicina tropical - Agosto de 2018
Bogotá, D.C., Colombia, S.A.

Portada: Comparación del tamaño de algunos insectos hematófagos. El insecto más pequeño es *Lutzomyia longipalpis*, de solo 2 mm de longitud, le sigue *Culex quinquefasciatus*, con el doble de su longitud, y *Rhodnius prolixus*, casi nueve veces más grande.

Cámara Nikon D7000™, lente macro de 105 mm, escala 1,1: 1

Fotografía de Raúl Pardo, Grupo de Entomología, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D. C., Colombia

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 38, Suplemento No. 2, Medicina tropical - Bogotá, D.C., Colombia - Agosto de 2018

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

Editores Asociados

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

Víctor Cárdenas
University of Texas
El Paso, TX, Estados Unidos

Alberto Concha-Eastman
Guatapé, Colombia

Zoilo Cuéllar
Academia Nacional de Medicina
Bogotá, D.C., Colombia

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

Patricia del Portillo
Corpogén
Bogotá, D.C., Colombia

Andrés de Francisco
Organización Mundial de la Salud
Ginebra, Suiza

Fernando De la Hoz
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

José Luis Di Fabio
Organización Panamericana de la Salud
Washington, D.C., Estados Unidos

Jorge Hernando Donado
Universidad Pontificia Bolivariana
Medellín, Colombia

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	Linda Grace Molano	Martha Renza	Elizabeth Guzmán	Johanna Morales
Edición y corrección de estilo	Asistencia editorial	Corrección de estilo	Mercadeo digital	Diagramación

© Instituto Nacional de Salud

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

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

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

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

URL: http://www.ins.gov.co
biomedica@ins.gov.co

Contenido

Editorial

El drama de las enfermedades tropicales desatendidas
Iván Darío Vélez 5

Presentación de caso

Leishmaniasis cutánea y embarazo
Ángel Jaimes, Gerzaín Rodríguez 8

Primer reporte de *Dioctophyma renale* (Nematoda, Dioctophymatidae) en Colombia
Ángel A. Flórez, James Russos, Nelson Uribe 13

Toxoplasmosis aguda diseminada fatal en una paciente adulta inmunocompetente proveniente del Pacífico colombiano
Armando Daniel Cortés, Natalia Aguirre 19

Artículo original

Cultivo *in vitro* de larvas L_3 de nematodos obtenidas del caracol gigante africano *Lissachatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) en Santa Fe de Antioquia
Nelly Solfania Heredia, Ann Sabrina Ávila, Luz Elena Velásquez 24

Detección molecular de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. y *Brucella* spp. en queso artesanal fresco comercializado en Barranquilla: un estudio piloto
Zamira E. Soto-Varela, Clara Gilma Gutiérrez, Yurina de Moya, Ramón Mattos, Hernando José Bolívar-Anillo, José Luis Villarreal 30

Variabilidad genética en regiones codificantes del antígeno de superficie y el dominio de la transcriptasa inversa de la polimerasa del virus de la hepatitis B, Colombia, 2002-2014
Dioselina Peláez-Carvajal, Nidia Janeth Forero, Martha Escalante-Mora, Katherine Laiton-Donato, José Aldemar Usme-Ciro 37

Detección molecular de leptospiras patógenas en roedores sinantrópicos y silvestres capturados en Yucatán, México
Marco Torres-Castro, Bayron Cruz-Camargo, Rodrigo Medina-Pinto, Bibiana Reyes-Hernández, Carlos Moguel-Lehmer, Rolando Medina, José Ortiz-Esquivel, William Arcila-Fuentes, Armando López-Ávila, Henry Noh-Pech, Alonso Panti-May, Iván Rodríguez-Vivas, Fernando I. Puerto 51

Características actuales de la coinfección con tuberculosis y el virus de la inmunodeficiencia humana en pacientes hospitalizados en Medellín, Colombia
Lina Ruiz, María Angélica Maya, Zulma Vanessa Rueda, Lucelly López, Lázaro Agustín Vélez 59

Infección concomitante por tuberculosis y el virus de la inmunodeficiencia humana: situación epidemiológica en el departamento del Meta, 2010-2015
Laura Plata-Casas, Óscar Gutiérrez-Lesmes, Óscar Herrán-Falla 68

Exposición y sensibilización a insectos en pacientes alérgicos en el trópico
Jorge Sánchez, Andrés Sánchez, Ricardo Cardona 80

Micobacteriosis identificadas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Colombia entre 2012 y 2016
Claudia Llerena, Angélica Valbuena, Angie Paola Zabaleta 87

Nuevas tabletas larvicidas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*: evaluación del efecto larvicida sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Colombia
Wilber Gómez-Vargas, Kelly Valencia-Jiménez, Guillermo Correa-Londoño, Faiber Jaramillo-Yepes 95

Conocimientos, prácticas y aspectos entomológicos del dengue en Medellín, Colombia: un estudio comparativo entre barrios con alta y baja incidencia
Celeny Ortiz, Guillermo L. Rúa-Uribe, Carlos A. Rojas 106

Diversidad genética y estructura poblacional de *Anopheles triannulatus* s.l. en Córdoba, Colombia, determinadas mediante el método de región de código de barras de ADN
María Atencia-Pineda, Angie Toro-Cantillo, Richard Onalbi Hoyos-López 117

Microcefalia en Colombia antes de la epidemia del Zika: revisión sistemática de la literatura
Estephanía Candelo, Gabriela Caicedo, Max M. Feinstein, Harry Pachajoa 127

Comunicación breve

Cambios ultraestructurales en núcleos de células C6/36 infectadas con virus dengue de tipo 2
Jorge Rivera, Aura Caterine Rengifo, Ladys Sarmiento, Taylor Díaz, Katherine Laiton-Donato, Martha Gracia, Sigrid Camacho, Myriam Velandia-Romero, Jaime Castellanos, María Leonor Caldas 135

Cartas al editor 144

Instrucciones a los autores

Contents

Editorial

The drama of neglected tropical diseases
Iván Darío Vélez 5

Case presentation

Cutaneous leishmaniasis and pregnancy
Ángel Jaimes, Gerzaín Rodríguez 8

First report of *Dioctophyma renale* (Nematoda, Dioctophymatidae) in Colombia
Ángel A. Flórez, James Russos, Nelson Uribe 13

Severe disseminated acute toxoplasmosis in an adult immunocompetent patient from the Colombian Pacific
Armando Daniel Cortés, Natalia Aguirre 19

Original articles

In vitro culture of L3 larvae of nematodes obtained from the African giant snail *Lissachatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) in Santa Fe de Antioquia
Nelly Solfania Heredia, Ann Sabrina Ávila, Luz Elena Velásquez 24

Molecular detection of *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Brucella* spp. in fresh artisanal cheese marketed in the city of Barranquilla: A pilot study
Zamira E. Soto-Varela, Clara Gilma Gutiérrez, Yurina de Moya, Ramón Mattos, Hernando José Bolívar-Anillo, José Luis Villarreal 30

Genetic variability in coding regions of the surface antigen and reverse transcriptase domain of hepatitis B virus polymerase, Colombia, 2002-2014
Dioselina Peláez-Carvajal, Nidia Janeth Forero, Martha Escalante-Mora, Katherine Laiton-Donato, José Aldemar Usme-Ciro 37

Molecular detection of pathogenic *Leptospira* in synanthropic and wild rodents captured in Yucatán, México
Marco Torres-Castro, Bayron Cruz-Camargo, Rodrigo Medina-Pinto, Bibiana Reyes-Hernández, Carlos Moguel-Lehmer, Rolando Medina, José Ortiz-Esquivel, William Arcila-Fuentes, Armando López-Ávila, Henry Noh-Pech, Alonso Panti-May, Iván Rodríguez-Vivas, Fernando I. Puerto 51

Current characteristics of tuberculosis and human immunodeficiency virus co-infection in a cohort of hospitalized patients in Medellín, Colombia
Lina Ruiz, María Angélica Maya, Zulma Vanessa Rueda, Lucelly López, Lázaro Agustín Vélez 59

Tuberculosis and human immunodeficiency virus coinfection: Epidemiological situation in the department of Meta, 2010- 2015
Laura Plata-Casas, Óscar Gutiérrez-Lesmes, Óscar Herrán-Falla 68

Exposure and sensitization to insects in allergic patients in the tropics
Jorge Sánchez, Andrés Sánchez, Ricardo Cardona 80

Mycobacterioses identified in the National Reference Laboratory of Colombia from 2012 to 2016
Claudia Llerena, Angélica Valbuena, Angie Paola Zabaleta 87

Novel larvicide tablets of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*: Assessment of larvicidal effect on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Colombia
Wilber Gómez-Vargas, Kelly Valencia-Jiménez, Guillermo Correa-Londoño, Faiber Jaramillo-Yepes 95

Knowledge, practices and entomological aspects of dengue in Medellín, Colombia: A comparative study of neighborhoods with high and low incidence
Celeny Ortiz, Guillermo L. Rúa-Uribe, Carlos A. Rojas 106

Genetic diversity and population structure of *Anopheles triannulatus* s. l. in the department of Córdoba, Colombia, using DNA barcoding
María Atencia-Pineda, Angie Toro-Cantillo, Richard Onalbi Hoyos-López 117

Microcephaly in Colombia before the Zika outbreak: A systematic literature review
Estephanía Candelo, Gabriela Caicedo, Max M. Feinstein, Harry Pachajoa 127

Brief communication

Nuclei ultrastructural changes of C6/36 cells infected with virus dengue type 2
Jorge Rivera, Aura Caterine Rengifo, Ladys Sarmiento, Taylor Díaz, Katherine Laiton-Donato, Martha Gracia, Sigrid Camacho, Myriam Velandia-Romero, Jaime Castellanos, María Leonor Caldas 135

Letters to the editor 144

Instructions for authors

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 38, Suplemento No. 2, Medicina tropical - Bogotá, D.C., Colombia - Agosto de 2018

Editorial

El drama de las enfermedades tropicales desatendidas

Las enfermedades tropicales desatendidas son un grupo de cerca de 20 enfermedades infecciosas presentes en 149 países, las cuales afectan a más de mil millones de personas en el mundo, principalmente en África, Asia y Latinoamérica. La gran mayoría se presenta en forma simultánea en un mismo lugar e, incluso, una persona puede padecer más de una de ellas simultáneamente. Desde el punto de vista institucional y social, estas enfermedades presentan una serie de dificultades que les son inherentes y aumentan el drama de las personas que las sufren. Entre estas, cabe destacar las características sociales y económicas de las poblaciones afectadas, las pocas opciones terapéuticas con que cuentan, la escasa información científica de calidad sobre la eficacia y la seguridad de los tratamientos disponibles, las dificultades de acceso a los tratamientos médicos y la tardanza con que los gobiernos actualizan los protocolos y las guías de manejo.

Además de su alta incidencia, las enfermedades tropicales desatendidas afectan a las poblaciones más pobres de los países más pobres. Son grandes núcleos de población de bajos ingresos y nivel de escolaridad, que viven en lugares remotos, apartados de los centros de atención médica, donde el acceso al agua potable y al saneamiento básico es limitado y, en ocasiones, inexistente. Se trata de poblaciones olvidadas y desatendidas, aquejadas por enfermedades que –aunque muchas veces son objeto de programas especiales de los ministerios de salud– no por ello reciben una atención suficiente, eficiente y oportuna pues, en ocasiones, implican mayores dificultades para acceder al tratamiento, como en el caso de la leishmaniasis cutánea, cuyo tratamiento no se consigue comercialmente en las farmacias y puede obtenerse únicamente mediando un diagnóstico parasitológico. Y es precisamente allí donde radica el problema, dada la poca formación del personal de salud en torno al manejo de la enfermedad y la toma y lectura de las pruebas diagnósticas, lo que obliga a los paciente a acudir en repetidas ocasiones al centro de salud, o a optar por tratamientos empíricos con sustancias cáusticas o con plantas, como hemos podido comprobarlo directamente con las comunidades residentes en los lugares que son focos naturales de la infección.

Como consecuencia del perfil de las poblaciones que las padecen, las enfermedades tropicales desatendidas no son atractivas para las compañías farmacéuticas debido a la escasa rentabilidad que representan, situación que se ha visto reflejada en el poco desarrollo de fármacos, vacunas y pruebas diagnósticas, así como de medidas de prevención y de control.

En diversos estudios se ha constatado que desde 1975 el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para estas enfermedades ha sido mínimo, comparado con el de los productos para combatir otro tipo de enfermedades; es la llamada “brecha 90/10”, es decir, el 90 % de los recursos que se destinan para la investigación en medicamentos se concentra en enfermedades que afectan al 10 % de la población mundial (1). Sumado a esto, los medicamentos para tratarlas generalmente son adquiridos y distribuidos directamente por los gobiernos, mecanismo que si bien permite que las poblaciones pobres tengan acceso gratuito a ellos, también limita su comercialización abierta por parte de las compañías farmacéuticas.

A estas dificultades debe sumarse el hecho de que, además de escasa, la investigación clínica de las enfermedades desatendidas es costosa, y lo que es peor, la poca investigación que se hace no se guía por normas unificadas, lo que deriva en estudios con multitud de diseños y resultados que no son comparables, y dificulta la realización de metaanálisis que permitirían hacer recomendaciones suficientemente sustentadas sobre esquemas de tratamiento bien definidos y ajustados a las características de los

pacientes y de las poblaciones. Para paliar esta situación, periódicamente la comunidad científica y los comités de expertos internacionales, liderados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), se reúnen para unificar los protocolos de los ensayos clínicos y emitir recomendaciones para el tratamiento de estas enfermedades. El material producto de estas reuniones se comparte con la comunidad académica y con las autoridades de salud de cada país y se pone a disposición de los gobiernos para que tomen decisiones y lo incorporen en las guías nacionales de manejo.

Si bien algunos países han aprovechado esta contribución para actualizar las guías de atención, otros, como es el caso de Colombia, no siempre tienen en cuenta dichas recomendaciones en el momento de revisar y ajustar sus protocolos. Un ejemplo de este problema es la reciente actualización de la guía de atención de la leishmaniasis en nuestro país; como se sabe, la leishmaniasis hace parte de las enfermedades tropicales desatendidas y su incidencia anual en Colombia es de 15.000 casos, aproximadamente, lo que ubica al país en el segundo lugar en las Américas en cuanto al número de casos (2).

En marzo de 2010 se llevó a cabo en la sede de la OMS en Ginebra el Segundo Comité de Expertos en Leishmaniasis, en el cual se trazaron nuevas recomendaciones para el tratamiento de las diferentes formas clínicas de esta enfermedad. La presencia de investigadores colombianos en dicho comité permitió socializar los avances clínicos nacionales y los aportes que el país ha hecho al estudio de la enfermedad. Antes de este encuentro, se llevaron a cabo revisiones sistemáticas de la literatura científica sobre alternativas terapéuticas, información que sirvió de base para la elaboración de las nuevas guías de manejo y control contenidas en el informe de la OMS (3).

Al año siguiente de la reunión de la OMS, la OPS, con el apoyo de la Universidad de Antioquia, reunió en Medellín a los expertos en leishmaniasis y a las autoridades de salud latinoamericanas para adaptar las recomendaciones del Comité de Expertos de la OMS al contexto latinoamericano con base en la información regional disponible. En dicha reunión se elaboró el documento denominado “Leishmaniasis en las Américas – Recomendaciones para el tratamiento” (4), el cual constituye una valiosa herramienta de apoyo para que los programas nacionales de control de la enfermedad en cada país estructuren los protocolos de tratamiento. Después de la reunión en Medellín se ha seguido recabando información científica en los diversos países sobre alternativas terapéuticas locales y sistémicas, además de estudios sobre la costo-efectividad de los esquemas terapéuticos.

En los dos documentos mencionados se introdujeron grandes cambios en las recomendaciones sobre los tratamientos con respecto a las adoptadas hace 20 años en la Primera Reunión del Comité de Expertos de la OMS. Después de la publicación de las nuevas guías de la OMS y la OPS, las guías colombianas no se actualizaron en los siguientes seis años, hasta que en el 2017 el Ministerio de Salud publicó las nuevas guías, pero en estas no se tuvieron en cuenta las recomendaciones de los comités de expertos y se mantuvieron esquemas terapéuticos que, dada su eficacia y seguridad, no deberían ser la primera elección para tratar a los pacientes colombianos (5).

Las universidades, los centros de investigación, así como algunas compañías farmacéuticas, se esfuerzan por generar nuevos conocimientos sobre las enfermedades tropicales desatendidas que permiten adecuar las guías de manejo a las nuevas realidades clínicas y desarrollos científicos. Por ello, es imperioso que las autoridades nacionales de salud de cada país se comprometan en la tarea permanente de actualizarlas con base en esas nuevas realidades clínicas y epidemiológicas y en los resultados de los ensayos clínicos sobre alternativas terapéuticas más seguras, económicas y eficientes.

Iván Darío Vélez
Director, Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Referencias

1. **Stevens P.** Diseases of poverty and the 10/90 Gap. Geneva: World Health Organization, International Policy Network; 2004. Fecha de consulta: 27 de julio de 2018. Disponible en: http://www.who.int/intellectualproperty/submissions/InternationalPolicyNetwork.pdf

2. **Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, *et al.*** Leishmaniasis, worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7:e35671.

3. **Organización Mundial de la Salud.** Control de las leishmaniasis. Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010. Serie de Informes Técnicos N° 949. Ginebra: OMS; 2010. p. 216-49. Fecha de consulta: 27 de julio de 2018. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/82766/WHO_TRS_949_spa.pdf?sequence=1

4. **Organización Panamericana de la Salud.** Leishmaniasis en las Américas, recomendaciones para el tratamiento. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2013. Fecha de consulta: 27 de julio de 2018. Disponible en: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/7704/9789275317525_esp.pdf

5. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Lineamientos para la atención clínica integral de leishmaniasis en Colombia. Fecha de consulta: 27 de julio de 2018. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/PAI/Lineamientos-leishmaniasis.pdf

Biomédica 2018;38:8-12
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.4034

PRESENTACIÓN DE CASO

Leishmaniasis cutánea y embarazo

Ángel Jaimes[1], Gerzaín Rodríguez[1,2]

[1] Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia

Se estudió a una mujer de 19 años, con embarazo de cuatro meses, que presentaba cuatro úlceras cutáneas de tres meses de evolución, diagnosticadas por biopsia como leishmaniasis cutánea. El frotis directo y la leishmanina fueron negativos.
Dado que todos los medicamentos usuales para la leishmaniasis cutánea están contraindicados en el embarazo, la paciente no recibió tratamiento, aunque curó espontáneamente durante el embarazo. Se cree que la leishmaniasis cutánea no tiene peligro para la mujer embarazada y que no hay transmisión de la madre al feto en el humano, aunque se ha detectado en animales en condiciones experimentales. La paciente tuvo un parto sin complicaciones y la condición de salud tanto de ella como de su hijo era normal a los dos años de seguimiento.

Palabras clave: leishmaniasis cutánea/terapia; embarazo; transmisión vertical de enfermedad infecciosa; hipertermia inducida.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.4034

Cutaneous leishmaniasis and pregnancy

We studied a 19-year-old woman, with a 4-month pregnancy who presented with four cutaneous leg ulcers of three months of evolution diagnosed by biopsy as cutaneous leishmaniasis. Direct smear and the leishmanin skin test were negative.
Since all the usual medications for cutaneous leishmaniasis are contraindicated in pregnancy, she did not receive any treatment but cured spontaneously of her lesions during pregnancy. It is believed that cutaneous leishmaniasis does not carry danger for pregnant women and that there is no maternal-fetal transmission in humans, though it occurs in experimental animals.
The patient gave birth without complications and both she and her son remained normal after two years of follow-up.

Key words: Leishmaniasis, cutaneous/therapy; pregnancy; infectious disease transmission, vertical; hipertermia inducida.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.4034

Caso clínico

Se trata de una mujer de 19 años de edad, procedente de Picaleña, Tolima, en la semana 16 de gestación. Tres meses antes había presentado una erupción máculo-papular generalizada durante dos semanas, la cual se resolvió sola, aunque persistieron algunas ulceraciones en las piernas, las cuales aumentaron de tamaño y presentaron secreción serosa, produciéndole dolor a la paciente (figura 1). La biopsia de una de las úlceras se diagnosticó como sugestiva de leishmaniasis o de micosis profunda.

La paciente y su esposo habían estado en la zona rural de Chaparral, Tolima, cinco meses atrás. El esposo había presentado una úlcera similar a las de la paciente hacía dos meses, la cual curó espontáneamente.

Examen físico

Se encontraron cuatro úlceras crateriformes, dos en cada pierna, de 3-4 por 2 cm, no dolorosas (figura 1). No había adenopatías y la mucosa nasal era normal.

Correspondencia:
Gerzaín Rodríguez, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia
Teléfono: (315) 648 2036
josert@unisabana.edu.co

Recibido: 14/08/16; aceptado: 19/11/17

Contribución de los autores:
Ángel Jaimes: historia clínica, atención, tratamiento y seguimiento del paciente
Gerzaín Rodríguez: estudio histopatológico, revisión de la literatura y escritura del manuscrito

En el examen directo de una de las lesiones no se encontraron amastigotes. La leishmanina fue negativa. En el cultivo se identificó *Streptococcus aureus;* se hizo una ecografía a las 17 semanas del embarazo, la cual fue normal.

En la revisión de la biopsia se encontró piel ulcerada con hiperplasia pseudocarcinomatosa e inflamación dérmica difusa granulomatosa, con macrófagos vacuolados y abundantes plasmocitos, así como un único conglomerado intradérmico de leucocitos polimorfonucleares y ocasionales amastigotes fagocitados (figura 2).

Figura 1. Úlceras de borde grueso y fondo granuloso, algunas hiperqueratósicas, en las piernas

Se recomendó crioterapia mientras culminaba el embarazo, tratamiento que no pudo efectuarse por la lejanía de la residencia de la paciente. A las 25 semanas de embarazo, todas las úlceras mostraban tendencia a cicatrizar espontáneamente. Se decidió seguir observándola mensualmente y no aplicar crioterapia.

En la revisión realizada dos meses después del parto, las lesiones habían cicatrizado, sin tratamiento específico. El niño había nacido con peso normal y estaba en buen estado general. Se decidió no suministrar tratamiento. Se le dio información general sobre la enfermedad y sobre su control en caso de una eventual recidiva o la aparición de alguna lesión mucosa.

La paciente asistió a las citas de control cada seis meses durante dos años, sin que se presentara recidiva de la enfermedad ni lesiones mucosas. El hijo está en condiciones normales.

Discusión

Este caso representa un desafío importante en cuanto al diagnóstico de la leishmaniasis cutánea. ¿Con qué frecuencia lo enfrenta el médico colombiano? ¿El riesgo de la enfermedad es diferente o especial en los casos de mujeres embarazadas? ¿Qué peligro tiene el hijo de sufrir leishmaniasis

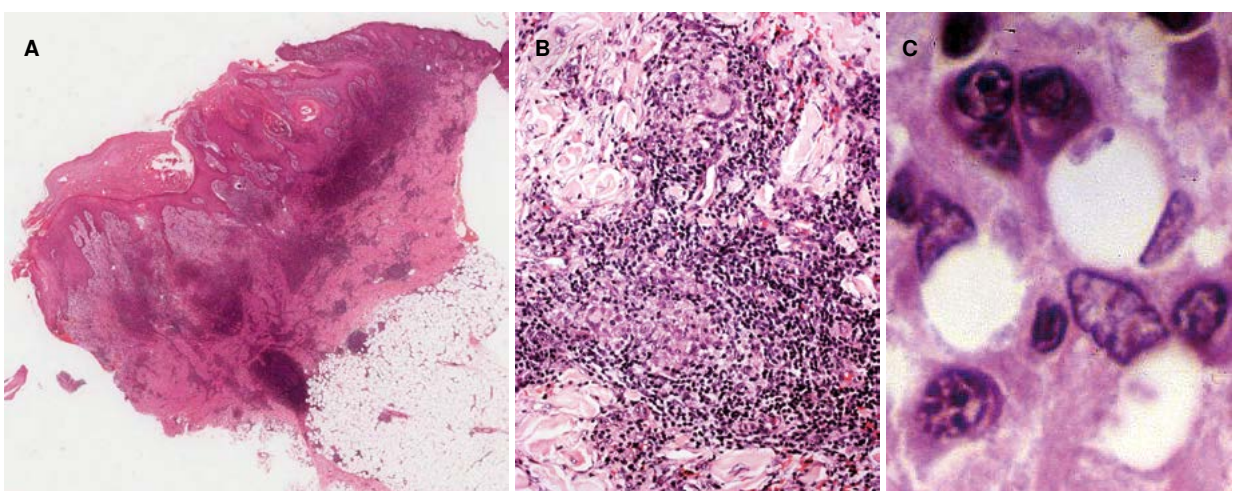

Figura 2. A. Imagen panorámica de la biopsia con hiperplasia notoria pseudocarcinomatosa e inflamación dérmica nodular y difusa que se extiende a la hipodermis superficial. Este patrón histológico sugiere de inmediato leishmaniasis cutánea. Hematoxilina y eosina, 2X. **B.** Foco de inflamación granulomatosa con células epitelioides, algunas gigantes, y numerosos linfocitos y plasmocitos. Hematoxilina y eosina, 20X. **C.** Plasmocitos y macrófagos vacuolados, uno de los cuales fagocita dos amastigotes. Hematoxilina y eosina, 100X

congénita o perinatal? ¿Qué tratamiento debe recibir una mujer embarazada con leishmaniasis? ¿Hay algún peligro para los niños convivientes de padres con leishmaniasis cutánea? ¿Cuál es el desafío que representa para los médicos colombianos la leishmaniasis en mujeres embarazadas?

Las leishmaniasis son enfermedades cuyas formas clínicas son la cutánea, la mucocutánea y la visceral, producidas por más de 20 especies de *Leishmania* que parasitan los macrófagos y que son transmitidas a los humanos por picaduras de insectos flebotomíneos (1,2). En Colombia se diagnosticaron 10.561 casos de la forma cutánea, 122 de la mucocutánea y 60 de la visceral en el 2016 (3). El 71 % de los casos de leishmaniasis cutánea ocurrió en hombres. No hay datos del porcentaje de mujeres en edad fértil entre los afectados, pero se supone que está alrededor del 30 % (2,3). Cuando se estudian focos de leishmaniasis con transmisión domiciliaria, la proporción entre hombres y mujeres es semejante; es posible que la mujer tienda menos a consultar o que tenga menor acceso a los programas de salud (4). La leishmaniasis cutánea en el embarazo se presenta ocasionalmente en nuestro medio, pero los datos mencionados invitan a investigar si pasa desapercibida.

Una situación parecida se presenta en Brasil, donde se registran 20.418 casos anuales (2) y son pocos los casos de leishmaniasis cutánea en el embarazo, a pesar de que 36 % de los pacientes son mujeres en edad fértil (5,6). El estudio que mayor número de casos reporta incluye 26 mujeres (5). En otro se señala que usualmente no se incluyen mujeres embarazadas en los estudios, que existe la posibilidad de reabsorción fetal o de aborto en los casos de leishmaniasis cutánea y que los datos epidemiológicos son insuficientes (6).

El embarazo disminuye la inmunidad celular de la madre (respuesta Th1) (6), por lo cual las enfermedades infecciosas, como la leishmaniasis cutánea, pueden ser más notorias, con lesiones más protuberantes y más ricas en amastigotes en mujeres embarazadas (5). Pueden presentarse varias formas de respuesta inmunitaria, las cuales atacan tanto a la infección como al feto, o lo protegen pero promueven la enfermedad (7). Sin embargo, estas pacientes con leishmaniasis cutánea no suelen presentar lesiones diseminadas ni lesiones mucosas metastásicas (5). En ellas se ha informado una mayor frecuencia de mortinatos y de parto prematuro (5).

En la paciente del caso que se presenta, llama la atención que no se detectaron los amastigotes en el examen directo, lo cual sugiere que había pocos parásitos. Asimismo, el resultado negativo de la leishmanina es un hallazgo que debe tenerse en cuenta en nuevos casos. En la biopsia se encontró el patrón usual de la leishmaniasis, con escasos amastigotes y, aunque se observó un conglomerado discreto de polimorfonucleares, no tenía la magnitud de los hallados en los casos de Brasil (5). Además, se observó un buen número de células epitelioides y gigantes, lo que indica una buena respuesta inmunitaria que no se correlaciona con la leishmanina negativa pero sí con la curación 'espontánea' de sus lesiones.

En los casos de mujeres embarazadas con leishmaniasis cutánea, el feto no tiene riesgo de sufrir la transmisión vertical de la enfermedad (5,6). Experimentalmente, en ratonas preñadas con leishmaniasis cutánea por *L. mexicana*, se demostraron reabsorción fetal, muertes fetales, menor peso al nacer, y presencia de ADN parasitario en la placenta y en el bazo de la madre y los fetos (8), es decir, hubo transmisión vertical de la enfermedad. Lo mismo ocurrió con hámsters preñadas, infectadas con *L. panamensis* en la primera semana de su embarazo, en cuyos hijos se encontró ADN leishmaniásico mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (9).

Estas complicaciones no se han demostrado en los humanos y se acepta que las diferentes formas etiológicas de la leishmaniasis cutánea no entrañan peligro de transmisión materno-fetal (5,6), aunque no hay estudios suficientes al respecto, porque, en general, no se estudia detalladamente la placenta (7). El médico debe estar vigilante y, en lo posible, hacer las pruebas para identificar la especie del parásito causante de la enfermedad. En esta paciente no fue posible estudiar la placenta ni identificar la especie del parásito.

Ella y su esposo se infectaron en Chaparral, en donde a partir del 2004, se presentó una epidemia con más de 3.000 casos de leishmaniasis cutánea, 95 % de los cuales se debieron a *L. guyanensis* y 5 % a *L. panamensis* (10).

En mujeres embarazadas con leishmaniasis visceral, el peligro para la madre y el feto es grande. En las madres, la enfermedad es más grave, incluso mortal, y el feto puede ser abortado, mortinato o tener transmisión vertical de la enfermedad, la cual suele expresarse en su primer año de vida (11,12). Por ello, es obligatorio que la madre reciba

tratamiento específico (11,12). La posibilidad de leishmaniasis visceral durante el embarazo en Colombia es muy remota, porque más del 90 % de los casos ocurre en menores de cinco años (1-3).

El tratamiento básico para las leishmaniasis en nuestro país es con antimoniato de meglumina (Glucantime®) y con fosfocolina (Miltefosina®), medicamentos que suministra gratuitamente el Ministerio de Salud y Protección Social (1). Ambos productos están contraindicados en el embarazo porque son teratogénicos (5-7).

El antimoniato de meglumina se ha asociado con aborto, prematuridad y malformaciones congénitas espinales (5,6,13). Se ha sugerido que la mujer embarazada con leishmaniasis cutánea no debe recibir tratamiento porque la enfermedad no entraña riesgo para ella ni para el feto, y porque en el posparto la inmunidad celular materna se recupera debido al aumento de la producción de sintetasa de óxido nítrico y de IFN-γ, esenciales para destruir el parásito (6). La curación espontánea es posible (5,6), como ocurrió con la paciente del presente caso.

Los tratamientos sustitutos incluyen la crioterapia (14) y el calor local, lo que ha demostrado ser de gran utilidad (15,16), pero no es de uso generalizado en nuestro país. El calor local con compresas de 40 a 45 °C varias veces al día puede ayudar a la involución de la lesión cutánea leishmaniásica (1). La anfotericina B, especialmente la liposómica, en dosis única de 10 mg/kg, ha sido útil en el tratamiento de la leishmaniasis visceral y es inocua para las madres y los fetos (14,17).

En conclusión, la leishmaniasis cutánea en el embarazo se presenta ocasionalmente en Colombia. Su aparición no entraña peligro de desarrollar una forma más grave de la enfermedad para la mujer embarazada, ni de transmisión vertical de la enfermedad. El tratamiento con antimoniato de meglumina o fosfocolina está contraindicado. La paciente puede permanecer en observación, sin tratamiento, o manejarse con crioterapia, termoterapia o con anfotericina B, preferiblemente liposómica. La paciente del presente caso curó espontáneamente durante su embarazo. Ni la madre ni su hijo sufrieron alteraciones.

Conclusiones

Aunque Colombia registra al año 10.000 a 12.000 casos de leishmaniasis cutánea, los casos de mujeres embarazadas con esta forma de la enfermedad son escasos.

Se cree que la leishmaniasis cutánea en mujeres embarazadas no entraña peligro especial para ellas o para el feto, y que no hay transmisión materno-fetal de la enfermedad.

Aunque en la mujer embarazada se disminuye la inmunidad celular, en una serie de 26 casos en Brasil, las lesiones de leishmaniasis cutánea tendieron a ser más prominentes, vegetantes, y a contener un buen número de amastigotes, lo cual no sucedió en el caso de la paciente cuyo caso se analiza, pues la prueba de leishmanina fue negativa y curó espontáneamente durante su embarazo, al igual que su esposo, quien también presentaba la enfermedad. Los dos la habían contraído en un área donde circulan *L. guyanensis* y *L. panamensis*, potenciales causantes de leishmaniasis mucocutánea, por lo cual se les instruyó sobre la posibilidad de presentarla y sobre la necesidad de consultar ante cualquier asomo de enfermedad mucosa.

Las mujeres embarazadas no deben recibir el tratamiento convencional para leishmaniasis cutánea, con antimoniato de meglumina o fosfocolina, porque estos medicamentos pueden ser teratógenos y abortivos. Debe mantenerse su vigilancia y no administrar tratamiento durante su embarazo; y aunque pueden recibirlo después del parto, no es raro que al recuperar su inmunidad celular la leishmaniasis cutánea cure espontáneamente. El calor local y la crioterapia son alternativas útiles e inocuas para estas mujeres.

La anfotericina B liposómica también es efectiva y, además, no es tóxica ni para la madre ni para el feto. Sin embargo, su inconveniente principal es el costo. Durante la lactancia la paciente puede recibir antimoniato de meglumina, pero se recomienda que lacte a su bebé seis horas después de recibir el medicamento, aunque no se ha establecido si este es tóxico para el bebé al ser secretado en la leche materna.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto alguno de intereses.

Financiación

Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta y Universidad de La Sabana

Referencias

1. **Rodríguez G, Arenas C, Ovalle C, Hernández CA, Camargo C.** Las leishmaniasis. Atlas y texto. Bogotá: Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta; 2016.

2. **Organización Panamericana de la Salud - Organización Mundial de la Salud.** Informe Leishmaniasis Nº 4, julio 2016. Ginebra; OPS: 2016.

3. **Instituto Nacional de Salud.** Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica número 52 de 2016. 25 de diciembre - 31 de diciembre, 2016. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2016. Fecha de consulta: 14 de julio de 2017. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2016%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2052%20-.pdf

4. **Vélez ID, Hendrickx E, Robledo SM, Agudelo SM.** Leishmaniosis cutánea en Colombia y género. Cad Saúde Pública. 2001;17:171-81. https://doi.org/10.1590/S0102-311X2001000100018

5. **Morgan DJ, Guimaraes LH, Machado PR, D´Oliveira Jr A, Almeida RP, Lago EL, *et al*.** Cutaneous leishmaniasis during pregnancy: Exhuberant lesions and potential fetal complications. Clin Infect Dis. 2007;45:478-82. https://doi.org/10.1086/520017

6. **Conceicao-Silva F, Morgado FN, Pimentel FM, Vasconcellos EC, Schubach AO, Valete-Roselino CM, *et al*.** Two women presenting worsening cutaneous ulcers during pregnancy: Diagnosis, immune response, and follow-up. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:e2472. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002472

7. **Berger BA, Bartlett AH, Saravia NG, Galindo SN.** Pathophysiology of *Leishmania* infection during pregnancy. Trends Parasitol. 2017;33:935-46. https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.08.012

8. **Ávila-García M, Mancilla-Ramírez J, Segura-Cervantes E, Farfán-Labone B, Ramírez-Ramírez A, Sevilla-Galindo N.** Transplacental transmission of cutaneous *Leishmania mexicana* strain in BALB/c mice. Am J Trop Med Hyg. 2013;89:354-8. https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0716

9. **Osorio Y, Rodríguez LD, Bonilla Dl, Peniche Ag, Henao H, Saldarriaga O, *et al*.** Congenital transmission of experimental leishmaniasis in a hamster model. Am J Trop Med Hyg. 2012;86:812-20. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0458

10. **Rodríguez-Barraquer I, Góngora R, Prager M, Pacheco R, Montero LM, Navas A, *et al*.** Etiologic agent of an epidemic of cutaneous leishmaniasis in Tolima, Colombia. Am J Trop Med Hyg 2008;78:276-82.

11. **Pagliano P, Carannante N, Rossi M, Gramiccia M, Gradoni L, Faella FS, *et al*.** Visceral leishmaniasis in pregnancy: A case series and a systematic review of the literature. J Antimicrobial Chem. 2005;55:229-33. https://doi.org/10.1093/jac/dkh538

12. **Turine-Neto P, Figueiró-Fihlo E, Oliveira V, Coehlo L, Breda I, Melo L, *et al*.** Visceral leishmaniasis and pregnancy: A retrospective study of cases reported in Brazil. Int J Gynecol Obstet. 2009;107(Suppl.2):S364. https://doi.org/10.1016/S0020-7292(09)61326-6

13. **Fontenele SJ, Freire GT, Gomes PM, Tolentino SM.** Treatment of American tegumentary leishmaniasis in special populations: A summary of evidence. Rev Soc Bras Med Trop. 2013;46:669-77. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0104-2013

14. **Layegh P, Pezeshkpoor F, Soruri AH, Naviafar P, Moghiman T.** Efficacy of cryotherapy versus intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) for treatment of cutaneous leishmaniasis in children. Am J Trop Meg Hyg. 2009;80:172-5.

15. **Vega JC, Sánchez BF, Montero LM, Montaña R, Mahecha MP, Dueñas B, *et al*.** The efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis in Colombia. A comparative observational study in an operational setting. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009;103:703-6. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.10.039

16. **López L, Robayo M, Vargas M, Vélez ID.** Thermotherapy. An alternative for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. Trials. 2012;13:58. https://doi.org/10.1186/1745-6215-13-58

17. **Sundar S, Chakravarty J, Agarwai D, Rai M, Murray HW.** Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. N Engl J Med 2010;362:604-12. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0903627

Biomédica 2018;38:13-8
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i4.4042

CASE PRESENTATION

First report of *Dioctophyma renale* (Nematoda, Dioctophymatidae) in Colombia

Ángel A. Flórez[1], James Russo[2], Nelson Uribe[3]

[1] Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agropecuarias, Programa de Medicina Veterinaria, Laboratorio de Parasitología, Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia
[2] Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto Universitario de la Paz (UNIPAZ), Barrancabermeja, Colombia
[3] Línea de Parasitología Humana y Veterinaria, Grupo de Investigación en Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM), Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Dioctophymosis is a zoonotic parasitic disease caused by *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782). It is distributed worldwide and it affects a large number of wild and domestic mammals.
Here we report the first confirmed case of canine dioctophymosis in Colombia. The animal was found dead in the streets of the municipality of Yondó, Antioquia, and its dead body was taken to the *Instituto Universitario de la Paz* (UNIPAZ) to carry out a necropsy.
A parasite worm was found in the right kidney and sent for identification to the *Laboratorio de Parasitología* of the *Universidad de Santander* (UDES). The specimen was identified as a male of *D. renale* upon observing the typical oval and transversely elongated bell-shaped bursa copulatrix with a spicule and no rays. Another important factor to confirm the diagnosis was the anatomical location in the kidney. This is the first time *D. renale* is reported in a stray dog in Colombia.

Key words: Dioctophymatoidea; Enoplida infections; case studies; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i4.4042

Primer reporte de *Dioctophyma renale* (Nematoda, Dioctophymatidae) en Colombia

La dioctofimosis es una enfermedad parasitaria zoonótica causada por *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782), de amplia distribución mundial, que afecta a un gran número de mamíferos silvestres y domésticos. Se reporta el primer caso de dioctofimosis canina en Colombia. El animal fue encontrado muerto en las calles del municipio de Yondó, Antioquia. Su cadáver fue llevado al Instituto Universitario de la Paz (UNIPAZ) donde se practicó la necropsia.
En el riñón derecho se encontró un parásito, el cual fue enviado al Laboratorio de Parasitología de la Universidad de Santander para su identificación. El espécimen se identificó como un macho de *D. renale* por la típica bursa copulatriz oval y alargada transversalmente en forma de campana, sin rayos y con una espícula. Otro factor importante para confirmar el diagnóstico fue la ubicación anatómica en el riñón. Se reporta por primera vez la presencia de *D. renale* en un perro mestizo callejero en Colombia.

Palabras clave: Dioctophymatoidea; infecciones por Enoplida; estudios de casos; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i4.4042

The nematode *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782) belongs to the order Enoplida, family Dioctophymatidae (1); it can measure up to 100 cm long and 1.2 cm in diameter (2,3). It is commonly called giant kidney worm and is one of the largest nematodes which parasitizes vertebrates.

This nematode has been reported to infect domestic carnivorous and wild animals such as dogs, foxes, minks, coyotes, ferrets, otters, cats, pigs, horses, cattle, and even humans (4-7). The parasitism it causes has spread throughout many parts of the world, with the possible exception of Africa and the Australian continent. In America, it has been reported in Argentina, Brazil, Canada, the United States, Paraguay and Uruguay (8).

Corresponding author:
Ángel A. Flórez, Laboratorio de Parasitología, campus universitario Lagos del Cacique, Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia
Teléfono: (577) 651 6500, extensión1395
angelflorezmvz@hotmail.com

Received: 24/08/17; accepted: 21/03/18

Author's contributions:
All authors contributed to the identification of the parasite, the discussion, the literature review and the drafting of the manuscript.

In the literature review we carried out for dioctophymosis in Colombia, we found only one study in a Neotropical otter population (*Lontra longicaudis*) that reports eggs with characteristics similar to *D. renale,* but no adult parasites were reported (9).

Dioctophyma renale is commonly described in dogs. Brazil and Argentina are the countries with the largest number of reported cases in mammals (5,10). In Brazil, cases have been reported in several states, including Rio Grande do Sul (3,11-20). Similarly, the canine dioctophymosis has been reported in various regions of Argentina (10,21-26) and Uruguay (27,28).

The life cycle of *D. renale* is indirect and it may involve different types of hosts until the parasite reaches maturity. The dog is defined as the definitive host (11,29). The aquatic annelid *Lumbriculus variegatus* is the specific intermediary host and fish from freshwater and *Chaunus ictericus* (Bufonidae) are considered paratenic hosts (13,29,30). The not-segmented egg is ingested by the intermediary host, hatches on the inside and the larva moves to reach the third stage that infects the definitive host or the paratenic host. The definitive hosts are infected by ingesting the intermediary host or the paratenic host. The third stage larva penetrates the wall of the stomach or duodenum, and then it migrates through the liver and peritoneal cavity until it reaches the kidney, predominantly the right one, but some parasites stay in the peritoneal cavity (8,31-33). However, the parasite has also been found in the left kidney, the abdominal cavity, the thoracic cavity, the ureters, the bladder and the subcutaneous tissue of dogs and other definitive hosts (11,13,34-36).

Normally the infection in dogs is subclinical (11,34), but the affected animals can present compressive atrophy of the parenchyma, dilation of the renal pelvis, and ureteral obstruction. The most striking lesion is the progressive destruction of the renal parenchyma, which, in the most severe cases, can reach a stage where only a thin capsule contains the parasite and hemorrhagic exudate (37,38).

The clinical presentation of dioctophymosis can be initially asymptomatic because the non-infected kidney is usually capable of assuming the functions of the infected one. Individuals typically present symptoms including renal colic, hematuria, and pyuria. If the parasite migrates to the ureter and the urethra, it blocks the flow of urine, which can lead to death by uremia and anuria.

The ectopic locations of the parasite in the liver, stomach, groin region, and mammary gland differentiate the clinical presentation, as well as the number of parasites in the definitive host (13,16-18).

The importance of these parasites for public health resides in their zoonotic potential demonstrated by the report of several human clinical cases (8,39-43).

Dioctophymosis is a zoonotic disease in which humans can be the definitive host, although the location of the parasite in the kidney is not the most frequent feature, as the peritoneum and the skin are the most frequent locations in humans (38-42). Risk factors for human infection include a high prevalence of infected canines, a high level of surface contamination, the use of rivers as a means of transportation, recreation and food fishing (fish, frogs, and eels) (10).

Here we report the first case of *D. renale* in Colombia detected in the necropsy of a dog found in the municipality of Yondó, Antioquia, located near the Magdalena river where the dog possibly consumed food contaminated with the parasite. Our report describes the lesions found in the dog and discusses how it could have been infected with this important nematode not previously reported in the country.

Case presentation

In August, 2015, the body of a dead dog found in the streets of the municipality of Yondó (Antioquia) was taken to the Instituto Universitario de la Paz to carry out a necropsy. The dog was a male mongrel about 8 years old and its weight was 10 kg. A parasite was found in its right kidney and was sent to the *Laboratorio de Parasitología* of the *University of Santander* (UDES) for identification.

Materials and methods

A complete post-mortem examination was performed for teaching purposes, giving special attention to the thoracic and abdominal cavities. The parasite was preserved in alcohol and sent to the *Laboratorio de Parasitología* at the *Universidad de Santander* (UDES) in Bucaramanga.

To identify the parasite, the morphological characteristics of the external genital structures of the genus, as well as the size and color of the nematode and its anatomical location, were taken into consideration (44,45). A definitive taxonomic key for the identification of this species is the presence in males of a bell-shaped copulatory bursa with no rays and a spicule measuring 0.5 to 0.6 cm long (46).

Discussion

The macroscopic features observed at the necropsy, such as the location of the parasite in the kidney and its red color, led to the identification of *D. renale* in almost a definitive way because of its large size, which makes this procedure an important diagnosis method. The final identification of the parasite as a male of *D. renale* was based on its morphological characteristics, mainly the typical bell-shaped bursa copulatrix with no rays and a protruding spicule of 0.5 to 0.6 cm in length (3,30,35,47,48), which are characteristic of this species (figure 1). The nematode measured 17 cm in length and 3 mm in diameter (figure 2). During the necropsy, no significant macroscopic lesions were observed.

In the literature review we carried out on dioctophymosis in Colombia, we found only one study in a Neotropical otter population (*L. longicaudis*). Only eggs with characteristics similar to *D. renale* were reported, so there was no certainty about the presence of adult parasites or about eggs effectively corresponding to the parasite (9).

The dead body of the dog did not present significant lesions, and it did not show signs that it had been hit by a car either. The parenchyma of the right kidney was completely destroyed and only the organ capsule was left (figure 3).

In the necropsy, a male specimen of *D. renale* was found in the right kidney of the animal. This anatomical location of the specimen coincided with the majority of reports of this parasite (3,11,12,27,37,49-51) and is related to the anatomical position of this organ in front of the duodenum, where *D. renale* frequently leaves the intestine during its migratory route (52). The location of the parasite in the left kidney is less frequent, as it occurs when it crosses the stomach in the greater curvature or develops a cyst around the liver associated with its migration through the lower curvature of the stomach (11).

In a retrospective study of 16 cases of *D. renale* infection in dogs, all diagnoses were based on necropsy findings (11). In most of the cases, the parasitic infection by *D. renale* in these animals was found during the necropsy. Clinical diagnosis is difficult given that signs and symptoms have no specificity and many individuals are asymptomatic (11,34,37,38,53).

In some cases, canine dioctophymosis can be diagnosed by parasitological examination of the urine (34,35), or during an exploratory laparotomy

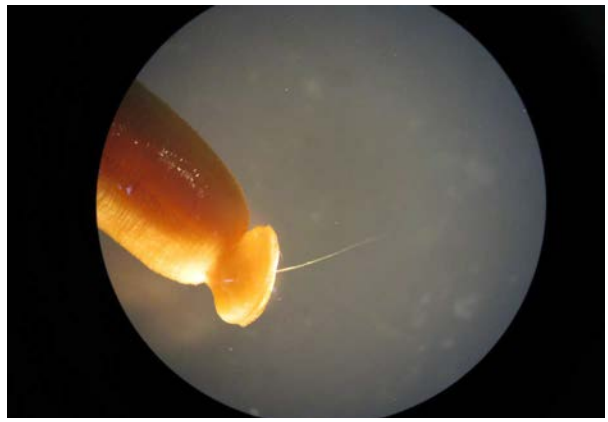

Figure 1. The large bell-shaped copulatrix bursa with a spicule that protrudes and no rays, characteristic of *Dioctophyma renale*

Figure 2. The parasite measured 17 cm in length and 3 mm in diameter; a reddish coloration was observed.

Figure 3. Parenchyma of the right kidney completely destroyed by the parasite after eating the insides of the kidney leaving only the renal capsule of the organ

of the abdominal cavity (38). In addition, in cases where there is a loss of renal parenchyma with concomitant hypertrophy of the non-parasitized kidney, the diagnosis can be done by performing an ultrasound (Oliveira LL, Attallah FA, Santos CL,

Wakofs TN, Rodrigues MC, Santos AE. O uso da ultrassonografia para o diagnóstico de *Dioctophyma renale* em ca˜o–relato de caso. In: Annals V Conferência Sul-americana de Medicina Veterinária. Rio de Janeiro, Brazil, 2005) or a radiograph (54).

In the case we report, only one adult parasite was found in the dog's right kidney. However, an unusual case of canine dioctophymosis was reported in Brazil, in which 28 worms of both sexes were found in the abdominal cavity of a 2-year-old male canine, and a single parasite in the right kidney (3). This may be the case with the largest number of specimens of *D. renale* in dogs ever reported.

The dog in our report was found in the streets of the municipality of Yondó (Antioquia), with access to the Magdalena River. It is very likely that this dog spent all its life living on the streets, feeding of garbage and discarded food. Taking into account these risk factors, it may have ingested the intermediate host or the paratenic host of *D. renale*. This is consistent with other reports by different authors in which canine dioctophymosis was found predominantly in stray dogs (11,13,34) and it may suggest that stray dogs are more susceptible to the infection, but the definitive condition is associated with the type of food that such dogs eat, unlike purebred dogs or domestic pets that normally remain indoors and are fed with a healthy and balanced diet (11,13). In a report from southern Brazil, a stray dog was fed with fish and its viscera, which was considered the main source for the infection (3).

This first case of *D. renale* in a stray dog in Colombia indicates that the parasite may complete its biological cycle in the local conditions of the place where it was found and that, therefore, it could be circulating in this region. Thus, it is necessary to carry out epidemiological studies in the area to determine risk factors for the transmission of the infection and to investigate whether there are more cases of the disease in dogs and even in humans, bearing in mind that it is a zoonosis.

The present case report proves for the first time the presence of the nematode *D. renale* in a canine in Colombia, which may indicate that in similar environments it would be possible to find the intermediate or paratenic host of this giant kidney worm.

Acknowledgments

We would like to express our deep and sincere gratitude to the *Laboratorio de Parasitología* of the *Facultad de Salud* at *Universidad Industrial de Santander* (UIS) and to Professor Jesús Antonio Betancourt-Echeverri for his support on identifying the parasite under study.

Conflicts of interest

None to declare

Funding

Universidad de Santander (UDES)

References

1. **Barriga O.** Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América Latina. Santiago: Editorial Germinal; 2002. p. 247.
2. **Kumar V, Vercruysse J, Vandesteene R.** Studies on two cases of *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782) infection in *Chrysocyon brachyurus* (Illiger). Acta Zool Pathol Antverp. 1972;56:83-98.
3. **Monteiro SG, Sallis LS, Stainki DR.** Infecção natural por trinta e quatro helmintos da espécie *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782) em um cão. Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia. 2002;9:95-9.
4. **Correa O, Bauer A.** Dioctofimose canina. Rev Fac Agron Vet UFRGS. 1967;5:37-41.
5. **Amato JF, Grisi L, Rosa VL.** Reunião dos casos brasileiros de dioctofimose canina, com registro de mais alta intensidade de infecção por *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782). Revista Brasilera Biologica. 1976;36:117-22.
6. **Mech LD, Tracy ST.** Prevalence of giant kidney worm (*Dioctophyma renale*) in wild mink (*Mustela vison*) in Minnesota. Am Midl Nat. 2001;145:206-9. https://doi.org/10.1674/0003-0031(2001)145[0206:POGKWD]2.0.CO;2
7. **Taylor MA, Coop RL, Wall RL.** Veterinary Parasitology. Third edition. Ames, Iowa: Blackwell Publishing; 2007. p. 430-1.
8. **Acha PN, Szyfres B.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. Third edition. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2003. p. 806-9.
9. **Jaramillo L, Arias L, Soler Tovar D.** Helmintos en heces de una población de nutria neotropical (*Lontra longicaudis*) de vida libre en el bajo río Sinú, Córdoba, Colombia (tesis). Bogotá: Universidad de la Salle; 2015. p. 100.
10. **Burgos L, Acosta R, Domingo FR, Archelli SM, Gamboa M, Linzitto OR, *et al*.** Prevalence of a zoonotic parasite, *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782), among male canines in a wild riverside area of La Plata river, province of Buenos Aires, Republic of Argentina. Rev Patol Trop. 2014;43:420-6. https://doi.org/10.5216/rpt.v43i4.33603
11. **Kommers GD, Ilha MR, Barros CL.** Dioctofimose em cães: 16 casos. Cienc Rural. 1999;29:517-22. https://doi.org/10.1590/S01038478199900030023
12. **Satiko KF, Shimada MT, Suzuki SN, Osaki SC, Bruno C, Vitto RF, *et al*.** Dioctophymosis occurrence in two dogs in Guarapuava city, Paraná State. Semin Cienc Agrar. 2003;24:177-80. https://doi.org/10.5433/1679-0359.2003v24n1p177

13. **Nakagawa TL, Bracarense AP, Reis AC, Yamamura MH, Headley SA.** Giant kidney worm (*Dioctophyma renale*) infections in dogs from Northern Paraná, Brazil. Vet Parasitol. 2007;145:366-70. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.10.027

14. **Colpo CB, Silva AS, Monteiro SG, Stainki DR, Camargo DG, Colpo ET.** Ocorrência de *Dioctophyma renale* em cães no município de Uruguaiana – RS. Rev FVZA. 2007;14: 175-80.

15. **Pedrassani D, Hoppe EG, Tebaldi JH, Nascimento AA.** *Chaunus ictericus* (Spix, 1824) as paratenic host of the giant kidney worm *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) (Nematoda: Enoplida) in São Cristóvão district, Três Barras county, Santa Catarina state, Brazil. Vet Parasitol. 2009;165:74-7. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.017

16. **Lemos LS, Santos ASO, Rodrigues ABF, Goulart MLVS, Almeida LG, Silveira LS.** Extrarenal lesion caused by *Dioctophyma renale* eggs in an erratic cycle in a dog. Int J Morphol.2010;28:1031-4. https://doi.org/10.4067/S0717-95022010000400008

17. **Stainki DR, Pedrozo JC, Gaspar LF, Zanette RA, Silva AS, Monteiro SG.** Urethral obstruction by *Dioctophyma renale* in puppy. Comp Clin Path. 2011;20:535-7. https://doi.org/10.1007/s00580-010-1169-0

18. **Sousa AA, de Sousa AA, Coelho MC, Quessada AM, de Freitas MV, Moraes RF.** Dioctophymosis in dogs. Acta Sci Vet. 2011;39:985.

19. **Silveira CS, Diefenbach A, Mistieri ML, Machado IR, Anjos BL.** *Dioctophyma renale* em 28 cães: aspectos clinicopatológicos e ultrassonográficos. Pesqui Vet Bras. 2015;35:899-905. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015001100005

20. **Silva RJ, Siqueira MC, Carra PS, Müller G, Borelli GF, Cerqueira SL, *et al*.** *Dioctophyme renale* (Nematoda: Enal. oplida) in domestic dogs and cats in the extreme south of Brazil. Braz J Vet Parasitol Jaboticabal. 2017;26:119-21. https://doi.org/10.1590/s1984-29612016072

21. **Niño SL.** Nueva observación de *D. renale* en perros de Buenos Aires. Rev Med Vet Parasit.1948;7:1-4.

22. **Ortega CF.** Dioctofimosis canina: descripción de un caso clínico. Analecta Vet. 1969;1:45-51.

23. **Morini E, Grillo Torrado C.** Pluriparasitismo abdominal en perro por *D. renale.* Asociación de Veterinarios Españoles Especialistas en Pequeños Animales.1978;1:6-9.

24. **Acosta WG, Burgos L, Radman NE.** Evaluación de la presencia renal y extrarrenal de *Dioctophyma renale* por ultrasonografia, en caninos y humanos de un área endémica. Reie. 2008;3:40.

25. **Meyer SN, Rosso M, Maza YE.** Hallazgo de *Dioctophyma renale* en la cavidad torácica de un canino. Rev Vet. 2013;24:63-5.

26. **Ruiz MF, Zimmermann RN, Aguirre FO, Stassi A, Forti MS.** Dioctofimosis: presentación de un caso clínico. Revista Veterinaria Argentina.2014;31:315.

27. **Bellini E, Ferreira C.** *Dioctophyma renale* en el perro. Primer hallazgo en Uruguay. Veterinaria. 2001;36:21-4.

28. **Hernández Z, Supparo E, dos Santos C, Nan F.** *Dioctophyma renale* en caninos (*Canis familiaris*) de Uruguay. Neotrop Helminthol. 2014;8:123-30.

29. **Pedrassani D.** Aspectos morfológicos, imunológicos e epidemiológicos de *Dioctophyme renale* em cães no distrito de São Cristóvão, Três Barras, Santa Catarina. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva. Jaboticabal, SP.: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista; 2009. p. 118.

30. **Alves GC, Silva DT, Neves MF.** *Dioctophyma renale*: o parasita gigante do rim. Revista Cientifica Eletrônica Medicina Veterinaria*.* 2007;4:1-6.

31. **Woodhead AE.** Life history cycle of the giant kidney worm, *Dioctophyma renale* (Nematoda), of man and many other mammals. Trans Am Microsc Soc. 1950;69:21-46.

32. **Hallberg CW.** *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782) a study of the migration routes to the kidneys of mammals and resultant pathology. Trans Am Microsc Soc. 1953;72:351-63.

33. **Bowman D.** Georgis Parasitología para veterinarios. Ninth edition. España: Elsevier; 2011. p. 464.

34. **Kano FS, Shimada MT, Suzuki SN, Osaki SC, Menarim BC, Ruthes FR, *et al.*** Ocorrência da dioctofimose em dois cães no município de Guarapuava/PR. Semin Cienc Agrar. 2003;24:177-80. https://doi.org/10.5433/1679-0359.2003v24n1p177

35. **Leite LC, Cirio SM, Diniz JM, Luz E, Navarro-Silva MA, Silva AW, *et al*.** Lesões anatomopatológicas presentes na infecção por *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782) em cães domésticos (Canis familiaris Linnaeus, 1758). Archives of Veterinary Science. 2005;10:95-101. https://doi.org/10.5380/avs.v10i1.4091

36. **Verocai GG, Measures LN, Azevedo FD, Correia TR, Fernandes JI, Scott FB.** *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782) in the abdominal cavity of a domestic cat from Brazil. Vet Parasitol. 2009;161:342-4. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.032

37. **Soulsby EJ.** Helminths, arthropods and protozoa of domestic animals. Sixth edition. London: Baillière, Tindall & Cassell; 1978. p. 326-7.

38. **Maxie MG.** The kidney. In: Jubb KV, Kennedy PC, Palmer N. The Pathology of Domestic Animals. Fourth edition. San Diego: Academic Press; 1993. p. 447-538.

39. **Beaver PC, Khamboonruang C.** Dioctophyma-like larval nematode in a subcutaneous nodule from man in Northern Thailand. Am J Trop Med Hyg. 1984;33:1032-4. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1984.33.1032

40. **Vibe PP.** Dioctophyma infection in humans. Med Parazitol (Mosk).1985;1:83-4.

41. **Sun T, Turnbull A, Lieberman PH, Sternberg SS.** Giant kidney worm (*Dioctophyma renale*) infection mimicking retroperitoneal neoplasm. Am J Surg Pathol. 1986;10:508-12.

42. **Urano Z, Hadçsegawa H, Katsumata T, Toriyam K, Aoki Y.** Dioctophymatid nematode larva found from human skin with creeping eruption. J Parasitol. 2001;87:462-5. https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0462:DNLFFH]2.0.CO;2

43. **Ignjatovic I, Stojkovic I, Kutlesic C, Tasic S.** Infestation of the human kidney with *Dioctophyma renale.* Urol Int. 2003;70:70-3. https://doi.org/10.1159/000067695

44. **Lapage G.** Parasitología Veterinaria. México, D.F.: Ed. Continental SA; 1979. p. 642.

45. **Soulsby EJ.** Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. Seventh edition. México: Interamericana; 1987. p. 823.

46. **Barriga O.** Dioctophymosis. En: Schultz MG, editor. Handbook series in zoonoses. Boca Ratón: CRC; 1982. p. 83-92.

47. **Anderson RC.** Nematode parasites of vertebrates: Their development and transmission. Second edition. Oxon, UK; CABI Publishing; 2000. p. 650.

48. **Measures LN.** Dioctophymatosis. In: Samuel WM, Pybus MJ, Kocan A, editors. Parasitic diseases of wild mammals. Second edition. Iowa: University Press; 2001. p. 357-64. https://doi.org/10.1002/9780470377000

49. **Silveira CS, Diefenbach A, Mistieri ML, Machado IR, Anjos BL.** *Dioctophyma renale* em 28 cães: aspectos clinicopatológicos e ultrassonográficos. Pesqui Vet Bras. 2015;35:899-905. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015001100005

50. **Freitas MG.** Helmintología veterinaria. Fourth edition. Belo Horizonte: Editora Rabelo & Brasil Ltda.; 1977. p. 267-70.

51. **Ferreira VL, Medeiros FP, July JR, Raso TF.** *Dioctophyma renale* in a dog: clinical diagnosis and surgical treatment. Vet Parasitol. 2010;168:151-5. https://doi.org/:10.1016/j.vetpar.2009.10.013

52. **Olsen OW.** Parasitología Animal. Barcelona: Editora AEDOS; 1977. p. 715-9.

53. **Osborne CA, Stevens JB, Hanlon GF.** *Dioctophyma renale* in a dog. J Am Vet Med Assoc. 1969;155:605-20.

54. **Brun MV, Beck CA, Mariano MB, Antunes R, Pigatto JA.** Nefrectomia laparoscópica em cão parasitado por *Dioctophyma renale* - Relato de Caso. Arq Ciê Vet Zool UNIPAR. 2002;5:145-52. https://doi.org/10.25110/arqvet.v5i1.2002.758

Biomédica 2018;38:19-23
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.4087

PRESENTACIÓN DE CASO

Toxoplasmosis aguda diseminada fatal en una paciente adulta inmunocompetente proveniente del Pacífico colombiano

Armando Daniel Cortés[1], Natalia Aguirre[2]

[1] Facultad de Salud, Departamento de Patología, Universidad del Valle, Cali, Colombia
[2] Programa de Anatomía Patológica y Patología Clínica, Universidad del Valle, Cali, Colombia

Se presenta el caso de una paciente inmunocompetente de 72 años de edad, proveniente del departamento del Chocó, con un cuadro clínico de 12 días de fiebre, cefalea, deterioro neurológico progresivo y rápida evolución a falla orgánica múltiple y muerte.
En el estudio histopatológico de los tejidos obtenidos en la necropsia, se identificaron quistes tisulares morfológicamente sugestivos de ser bradizoítos de *Toxoplasma gondii,* lo que se confirmó mediante inmunohistoquímica en corazón, cerebro y músculo estriado.

Palabras clave: *Toxoplasma*; toxoplasmosis; miocarditis; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.4087

Severe disseminated acute toxoplasmosis in an adult immunocompetent patient from the Colombian Pacific

We present the case of a 72-year-old immunocompetent patient from Chocó, Colombia, with a 12-day course of fever, headache, progressive neurological deterioration, and rapid evolution to multiorgan failure and death.
In the histopathological study of tissues obtained at necropsy, tissue cysts morphologically suggestive of being bradyzoites of *Toxoplasma gondii* were identified and confirmed by immunohistochemistry in heart, brain, and striated muscle.

Key words: *Toxoplasma*; toxoplasmosis; myocarditis; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.4087

La toxoplasmosis es una zoonosis parasitaria de distribución mundial. Los seres humanos generalmente se infectan por el consumo de carne o de verduras poco cocidas, o de agua contaminada por heces de gatos. Habitualmente, se presenta de forma asintomática en huéspedes sanos, o produce una enfermedad similar a la mononucleosis infecciosa con adenopatía cervical en el 10 % de los sujetos (1). Los casos graves de toxoplasmosis y las manifestaciones clínicas, como la miocarditis y la encefalitis, son raras y se desarrollan con frecuencia en pacientes inmunocomprometidos (2,3), especialmente en aquellos con sida.

Correspondencia:
Natalia Aguirre, Carrera 60 N° 10-31, apartamento 502 D, Unidad Santa Anita, Cali, Colombia
Teléfono: (300) 231 2381
natav20@hotmail.com

Recibido: 26/10/17; aceptado: 30/05/18

Se presenta el caso de una paciente inmunocompetente con un cuadro de deterioro neurológico progresivo y rápida evolución a falla orgánica múltiple y muerte.

Reporte de caso

Se trata de una paciente de 72 años de edad que fue llevada por sus familiares al servicio de urgencias de un hospital de tercer nivel en Cali (Colombia), por un cuadro clínico de 12 días de evolución consistente en elevación no cuantificada de la temperatura, asociada con cefalea intensa y deterioro neurológico progresivo.

En el momento del ingreso, la paciente no respondía al llamado, estaba febril (38,4 °C), con taquicardia (112 latidos por minuto), taquipnea (28 respiraciones por minuto), saturación arterial de oxígeno (SaO_2) de 86 %, movimientos tónicos de los miembros superiores e incontinencia urinaria.

Contribución de los autores:
Natalia Aguirre: elaboración del informe definitivo de la necropsia clínica de la paciente
Armando Cortés: revisión y dirección de los residentes en el proceso de la realización de las necropsias, revisión de los informes y dictamen del diagnóstico definitivo

Una hora después del ingreso, presentó falla respiratoria, y requirió intubación orotraqueal y asistencia respiratoria mecánica. Con la impresión diagnóstica de infección del sistema nervioso central, se inició el tratamiento antibiótico con cefepime, vancomicina y ampicilina.

En los exámenes de ingreso se encontró trombocitopenia (29.000/mm^3), elevación de la creatinina (3 mg/dl), la deshidrogenasa láctica (985 UI/l) y la creatina-fosfocinasa (CPK) (1.176 UI/L). Los estudios para leptospirosis, malaria, HIV y dengue, fueron negativos, así como la punción lumbar con presión de apertura de 13 cm H_2O y pleocitosis a expensas de los neutrófilos (12/mm^3); los niveles de proteínas eran de 106 mg/dl y, los de glucosa, de 68 mg/dl.

En la tomografía computadorizada (TC) de cerebro, se observó hidrocefalia con ventriculomegalia e hipodensidades periventriculares (figura 1) y en la de tórax de alta resolución, un patrón en vidrio esmerilado con atelectasia del lóbulo inferior pulmonar izquierdo (figura 2).

Con base en los hallazgos de las imágenes diagnósticas y el cuadro clínico de la paciente, el grupo de médicos tratantes consideró que se trataba de un posible cuadro de tuberculosis pulmonar y meníngea, por lo que se prescribió, además, el tratamiento tetraconjugado para tuberculosis.

A pesar del tratamiento, la paciente evolucionó rápidamente a una falla orgánica múltiple y falleció a los diez días del ingreso. Se hizo la autopsia y en el estudio histopatológico de tejido miocárdico, cerebral y de músculo esquelético, se encontraron quistes tisulares con formas sugestivas de bradizoítos de *Toxoplasma gondii* (figuras 3-7). Estos se sometieron al estudio de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo monoclonal específico para la proteína de membrana P30 de *T. gondii* (Novocastra™, clon TP3), purificado a partir de líquido ascítico de ratón y diluido en una solución tampón de fosfato salino (PBS), pH 7,6, con albúmina de suero bovino (BSA) al 1 % y 0,09 % de azida de sodio, cuyo resultado confirmó la presencia del parásito en los tejidos evaluados (figuras 8-10).

Discusión

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario intracelular obligado, cuyos huéspedes definitivos son los félidos domésticos y salvajes; en ellos se desarrollan las etapas sexuales y asexuales de su ciclo biológico (4). En el humano y en diversos huéspedes intermediarios que ingieren quistes

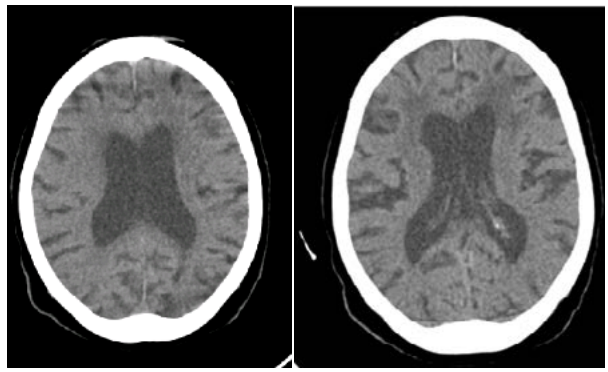

Figura 1. Tomografía computadorizada de cerebro: se observan hidrocefalia e hipodensidades periventriculares fronto-parietales.

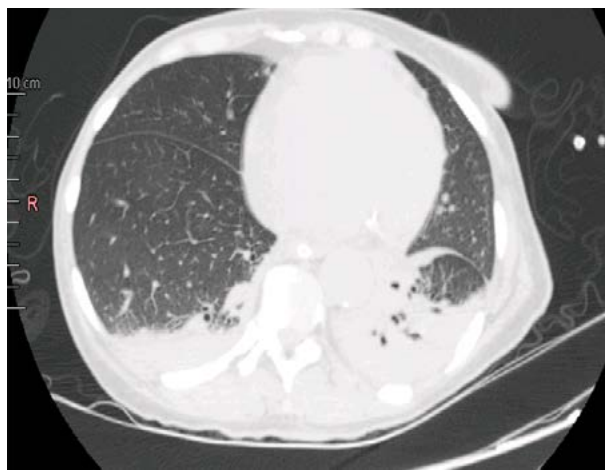

Figura 2. Tomografía computadorizada de tórax: patrón en vidrio esmerilado con atelectasia de lóbulo inferior pulmonar izquierdo

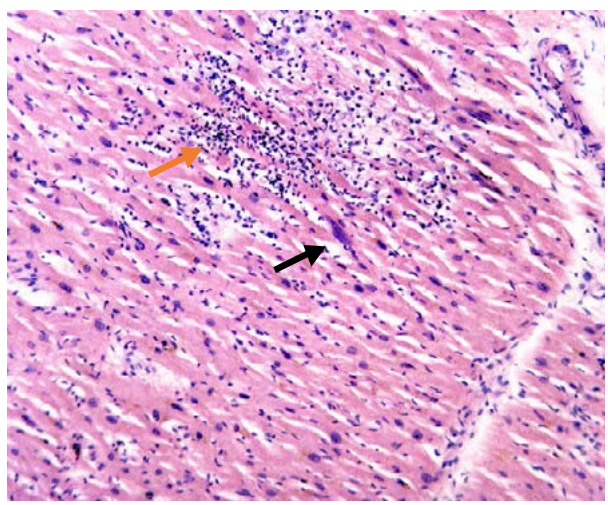

Figura 3. Músculo cardiaco con extenso infiltrado inflamatorio mononuclear (flecha naranja) y un quiste en la fibra muscular con formas sugestivas de bradizoítos (flecha negra). Hematoxilina y eosina, 4X.

con bradizoítos u ooquistes con esporozoítos, los parásitos invaden las células de la mucosa de las vías digestivas, donde se diferencian en taquizoítos y se multiplican localmente antes de diseminarse por vía sanguínea o linfática. Tienen la capacidad de invadir todas las células nucleadas del cuerpo, aunque los órganos preferidos son los ganglios linfáticos, el cerebro, el corazón y los pulmones (5).

El diagnóstico puede hacerse mediante pruebas serológicas, amplificación de secuencias específicas de ácido nucleico (reacción en cadena de la polimerasa, PCR), demostración histológica del parásito o de sus antígenos (tinción con inmunoperoxidasa) o por aislamiento del organismo. Otros métodos raramente usados incluyen la demostración de antigenemia y del antígeno en suero y fluidos corporales, la prueba cutánea de toxoplasmina y la transformación de linfocitos específicos del antígeno (6).

La prevalencia de la infección por *T. gondii* en Europa ha disminuido en las últimas cuatro décadas. En Francia, por ejemplo, la seroprevalencia general de la infección en mujeres en edad fértil disminuyó de 54 % en 1995 a 37 % en 2010; en los Estados Unidos, es de 15,8 a 19,2 %; en Suramérica, se presentan tasas mayores que alcanzan el 73 % en Brasil y oscilan entre el 26 y el 77 % en Colombia (7).

En la mayoría de los casos, la infección es asintomática y solo el 10 % de las personas presentan síntomas que, generalmente, corresponden a una afección leve y de resolución espontánea. Los cuadros diseminados y las complicaciones graves de la infección con este parásito, usualmente se describen en personas inmunocomprometidas; sin embargo, desde 1998 se vienen publicando reportes de casos de pacientes inmunocompetentes con cuadros graves.

El estudio de dichos casos ha permitido identificar cepas silvestres de *T. gondii* cuya infección ha originado tasas de mortalidad de hasta 27 % en una de las series (8). Los casos reportados en Guyana Francesa, Brasil y Surinam (2,8,9), evidenciaron que las cepas atípicas podrían presentar una mayor capacidad patógena y, en algunas aisladas en Suramérica, se han identificado genotipos atípicos y una mayor diversidad en comparación con las descritas en Norteamérica y Europa, todas ellas asociadas con cuadros clínicos más graves en ratones y en seres humanos (10,11).

En el 2013, De la Torre A, *et al*., publicaron un estudio en el que se evaluaron 19 casos de

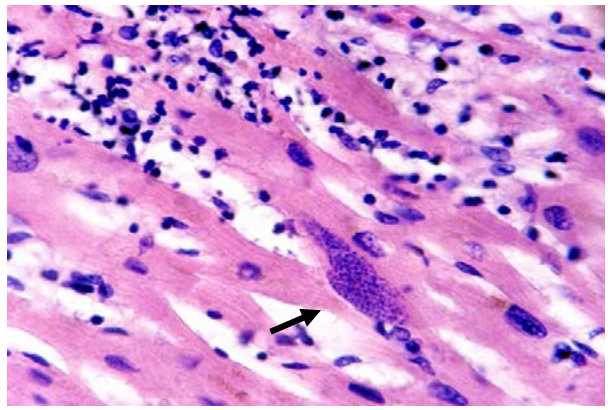

Figura 4. Quiste en músculo cardiaco con formas sugestivas de bradizoítos (flecha). Hematoxilina y eosina, 10X.

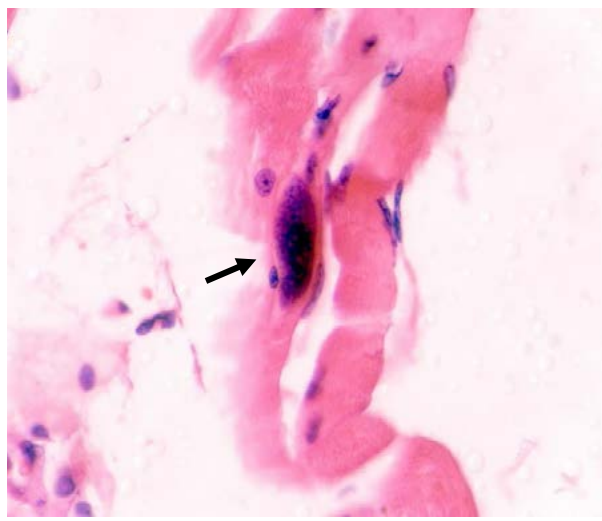

Figura 5. Quiste en músculo estriado con formas sugestivas de bradizoítos (flecha). Hematoxilina y eosina, 10X.

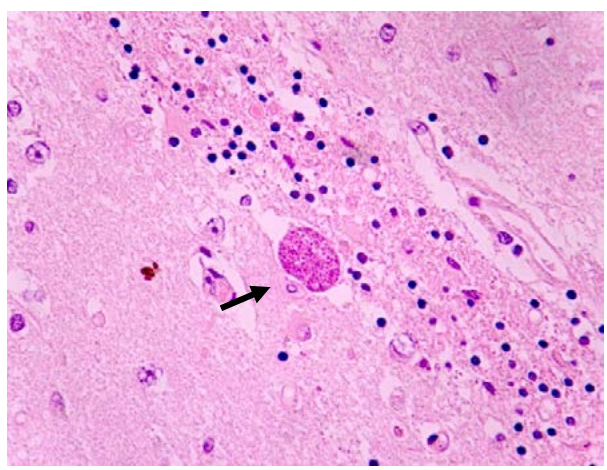

Figura 6. Tejido cerebral con necrosis focal y quiste con formas sugestivas de bradizoítos (flecha). Hematoxilina y eosina, 40X.

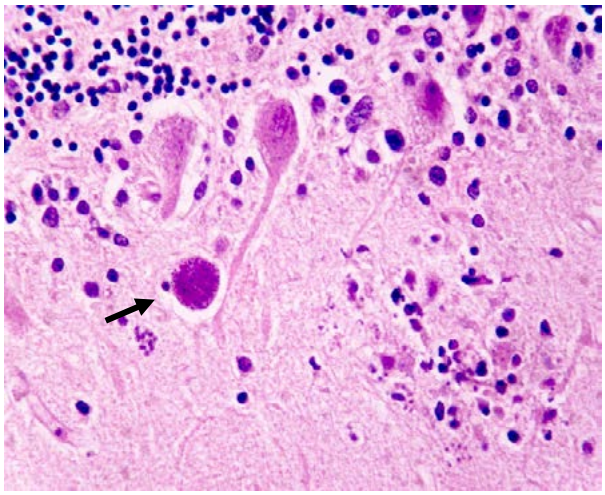

Figura 7. Corte histopatológico de cerebelo con quiste que contiene formas sugestivas de bradizoítos (flecha). Hematoxilina y eosina, 40X.

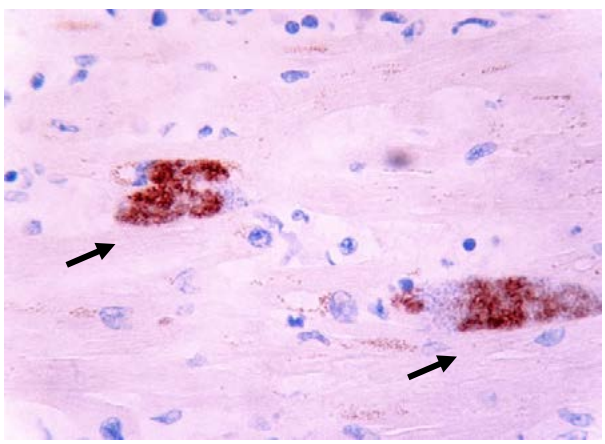

Figura 8. Estudio de inmunohistoquímica positivo para *Toxoplasma gondii* en músculo cardiaco (flecha), 40X

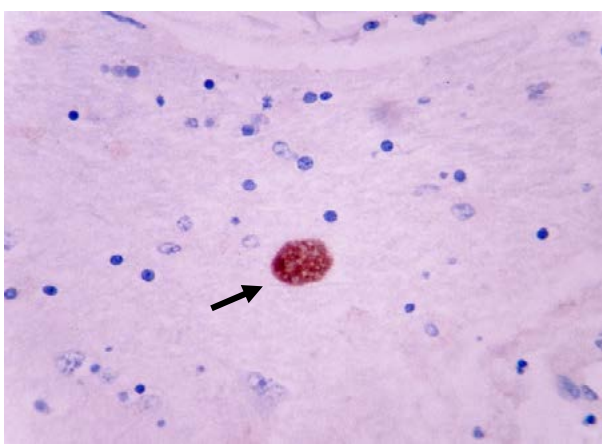

Figura 9. Estudio de inmunohistoquímica positivo para *Toxoplasma gondii* en cerebro (flecha). 40X

pacientes franceses y 23 casos de colombianos con toxoplasmosis ocular activa confirmada, cuyas reacciones clínicas, parasitológicas e inmunológicas se compararon y se relacionaron con las cepas. Los autores encontraron que los pacientes colombianos poseían serotipos atípicos heterogéneos, en tanto que en los franceses la reacción a los péptidos de la cepa de tipo II era uniforme y que, en cambio, los patrones de proteína reconocidos por los anticuerpos oculares y los de las citocinas eran diferentes entre las dos poblaciones. En los pacientes franceses, se observó una gran respuesta inflamatoria con incremento de los niveles de IL-6, IL-1β, IL-8, MIP-1β, MCP-1 y G-CSF, en tanto que en los pacientes colombianos se registró una baja expresión de citocinas proinflamatorias incluidas las IFN-γ, IL-15, IL-17, IL-2, IL-10, MIP-1β, GM-CSF y G-CSF, con la excepción de los niveles elevados de TNF-α e IL-6 (12).

En junio del 2009, Pino, *et al*., reportaron un brote epidémico causado por *T. gondii* en personal militar que desarrollaba operaciones en el área de la serranía de La Macarena (Meta). De los 19 casos sospechosos, solo uno fue positivo para el HIV y el resto no presentaba inmunodeficiencia. En estos pacientes, predominó el compromiso del sistema reticuloendotelial evidenciado por la presencia de adenomegalias superficiales (100 % de los casos). Debe anotarse que en dicho brote de toxoplasmosis aguda hubo un alto porcentaje de compromiso pulmonar, gastrointestinal e, incluso, un caso grave de compromiso del miopericardio (13).

La paciente cuyo caso se presenta era una ama de casa previamente sana de 72 años de edad, cuya historia clínica, confirmada posteriormente por la familia, no registraba antecedentes ni evidencia

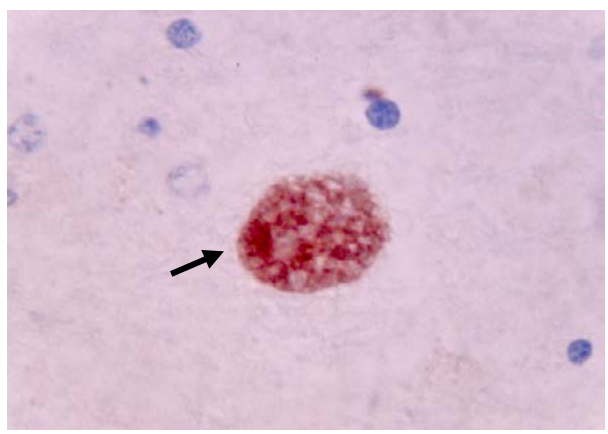

Figura 10. Estudio de inmunohistoquímica positivo para *Toxoplasma gondii* en cerebro. 100X

de infecciones recurrentes, como tampoco enfermedades metabólicas ni exposición a tratamientos inmunosupresores u otros factores de riesgo para el desarrollo de una inmunodeficiencia secundaria que facilitara la infección y la progresión de la enfermedad tal como sucedió (14).

Provenía de la vereda de Fugiado, municipio de Istmina, en el departamento del Chocó, región selvática del Pacífico colombiano localizada sobre la cuenca de los ríos Atrato y San Juan, de difícil acceso, donde no se cuenta con agua potable y no hay una adecuada manipulación y cocción de los alimentos, aspectos que, sumados al consumo de carne de animales selváticos, podrían ser factores de riesgo para la transmisión de este parásito y el desarrollo de una infección que terminó en la muerte de la paciente.

No se detectaron cuadros clínicos similares en los familiares ni en otros miembros de la comunidad. No obstante, sería importante estudiar el lugar para la eventual detección de otros casos, pues este es el primero de toxoplasmosis aguda diseminada reportado en una paciente inmunocompetente en la región del Pacífico colombiano, el cual se explicaría por el desconocimiento de las nuevas cepas atípicas y su efecto en pacientes inmunocompetentes, así como por su rápida evolución y por el hecho de que no se indagó suficientemente sobre los factores de riesgo y ello impidió que los médicos tratantes estuvieran alertas frente a la enfermedad.

Por ello, es importante conocer y estudiar este tipo de casos, pues el parásito puede contarse entre los nuevos genotipos que se investigan actualmente, y cuya diversidad y recombinación genética están generando nuevos mecanismos patogénicos (15). Esto permitiría establecer medidas de detección y tratamiento oportunas, así como estrategias de prevención en estas zonas de alto riesgo.

Consideraciones éticas

Se contó con la autorización de la familia de la paciente para publicar el caso.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiación

No se recibió financiación alguna.

Referencias

1. **Sobanski V, Ajzenberg D, Delhaes L, Bautin N, Just N.** Severe toxoplasmosis in immunocompetent hosts: Be aware of atypical strains. Am J Respir Crit Care Med. 2013; 187:1143-5. https://doi.org/10.1164/rccm.201209-1635LE
2. **Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, *et al.*** Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. J Clin Microbiol. 2002;40:4037-44. https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4037-4044.2002
3. **Montoya J, Liesenfeld O.** Toxoplasmosis. Lancet. 2004;363: 1965-76. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X
4. **Saadatnia G, Golkar M.** A review on human toxoplasmosis. Scand J Infect Dis. 2012;44:805-14. https://doi.org/10.3109/00365548.2012.693197
5. **Nunura J, Endo S, Salazar D, Rodríguez A, Pereyra S, Solís H, *et al*.** Disseminated toxoplasmosis in an immunocompetent patient from Peruvian Amazon. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010;52:107-10. https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000200008
6. **Montoya J.** Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 2002;185(Suppl.1): S73-82. https://doi.org/10.1086/338827
7. **Petersen E, Ajzenberg D, Mandelbrot L, Gómez-Marín JE.** Protozoan diseases: Toxoplasmosis. International Encyclopedia of Public Health. Second edition. Elsevier; 2017. p. 114-32. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00361-1
8. **Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, *et al*.** Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: Epidemiological, clinical, and parasitological aspects. Clin Infect Dis. 2007;45:88-95. https://doi.org/10.1086/521246
9. **Leal F, Cavazzana C, Franco De Andrade H, Galisteo AJ Jr, de Mendonça JS, Kallas EG.** *Toxoplasma gondii* pneumonia in immunocompetent subjects: Case report and review. Clin Infect Dis. 2007;44:e62-6. https://doi.org/10.1086/511871
10. **Demar M, Hommel D, Djossou F, Peneau C, Boukhari R, Louvel D, *et al*.** Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. Clin Microbiol Infect. 2012;18:E221-31. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03648.x
11. **Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, Su C.** Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. Int J Parasitol. 2008;38:561-9. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004
12. **De la Torre A, Sauer A, Bourcier T, Speeg-Schatz C, Ballonzoli L, Ajzenberg D, *et al*.** Severe South American ocular toxoplasmosis is associated with decreased IFN-gamma/IL-17A and increased IL-6/IL-13 intraocular levels. PLoS Neglected Trop Dis. 2013;7:e2541. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002541
13. **Pino L, Salinas J, López M.** Description of an epidemic outbreak of acute toxoplasmosis in immunocompetent patients from Colombian Armed Forces during jungle operations. Infectio. 2009;13:83-91. https://doi.org/10.1016/S0123-9392(09)70729-5
14. **Zea F.** Inmunocompentencia en adultos: más que VIH negativo. Colombia Médica. 2016;47:176. https://www.redalyc.org/pdf/283/28348402007.pdf
15. **Darde ML.** *Toxoplasma gondii,* "new" genotypes and virulence. Parasite. 2008;15:366-71. https://doi.org/10.1051/parasite/2008153366

Biomédica 2018;38:24-9
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3408

ARTÍCULO ORIGINAL

Cultivo *in vitro* de larvas L_3 de nematodos obtenidas del caracol gigante africano *Lissachatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) en Santa Fe de Antioquia

Nelly Solfania Heredia[1], Ann Sabrina Ávila[1], Luz Elena Velásquez[1,2]

[1] Grupo de Microbiología Ambiental, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[2] Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. Más de 170 municipios colombianos están invadidos por *Lissachatina fulica,* caracol africano que puede portar larvas de nematodos de interés en salud humana y veterinaria. Los parásitos entran al caracol huésped intermediario en el estadio de larva L_1, y allí cambian a L_2 y L_3, formas estas capaces de infectar a vertebrados.
Objetivo. Estandarizar el cultivo *in vitro* de las L_3 portadas por especímenes de *L. fulica* recolectados en Santa Fe de Antioquia.
Materiales y métodos. Entre julio y noviembre de 2014 se recolectaron 10 caracoles, se sacrificaron y se digirieron con ácido clorhídrico al 0,7 %. Las larvas se recuperaron mediante la técnica de Baermann; se cultivaron 36 días en los medios Schneider, mínimo esencial de *Eagle modificado por Dulbecco* (*Dulbecco's Modified Eagles Minimal Essential Medium*, DMEM), y Roswell Park Memorial Institute (RPMI), con suero fetal bovino (SFB) al 20 % y sin este, y agua destilada con SFB al 20 %. Los medios de cultivo se cambiaron cada 36 horas. Las larvas se midieron con el microscopio utilizando reglilla ocular, y se evaluaron la supervivencia, la longitud y el ancho. Se calcularon datos estadísticos de resumen y se hicieron gráficos de cajas y bigotes, así como la prueba t de Student. El nivel de significación (p) se estableció como menor de 0,05.
Resultados. El 50 % de las larvas sobrevivió, 85 % en DMEM con SFB al 20 %, el 70 % con RPMI más SFB al 20 %, el 60 % en RPMI, el 50 % en Schneider más SFB al 20 %, el 45 % en Schneider y el 40 % en DMEM. El control sobrevivió diez días. Hubo diferencias significativas entre la longitud inicial promedio de las larvas y la longitud final promedio en los medios con suplementos: inicial, 645,83 µm; final en DMEM más SFB al 20 %, 732,65 µm ($p<0,001$); en RPMI más SFB al 20 %, 718,79 µm ($p<0,001$), y en Schneider más SFB al 20 %, 696,12 µm ($p<0,01$). No hubo diferencias significativas entre la anchura inicial promedio, de 24,99 µm, y la final.
Conclusiones. El mejor medio para cultivar las L_3 de *L. fulica* fue el DMEM más SFB al 20 %. En la evaluación del crecimiento larval, la longitud fue más informativa que la anchura. Las larvas estudiadas no correspondieron a *Angiostrongylus cantonensis*, *A. costaricensis* ni *Aelurostrongylus abstrusus*.

Palabras clave: nematodos; caracoles; medios de cultivo; técnicas *in vitro*; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3408

In vitro culture of L_3 larvae of nematodes obtained from the African giant snail *Lissachatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) in Santa Fe de Antioquia

Introduction: Over 170 municipalities in Colombia have been invaded by *Lissachatina fulica*, an African snail that can carry larvae of nematodes of interest in human and veterinary health. Nematodes enter the host snail as larvae L_1 and then change to L_2 and L_3, the infectious form for vertebrates.
Objective: To standardize culture *in vitro* of L_3 carried by *L. fulica* from Santa Fe de Antioquia.
Materials and methods: Between July and November, 2014, 10 snails were collected, killed, and conserved with HCl 0.7%. Larvae were recovered using the Baermann technique and cultured for 36 days in Schneider, DMEM and RPMI media, with and without SFB 20% and distilled water with SFB 20%. Replacements were made every 36 hours; larvae were measured with an ocular micrometer on a microscope. Summary statistics were estimated; box and whisker plots were made; the t Student test was performed in SPSS 18™. A p-value below 0.05 was assumed as significant.
Results: Fifty per cent of the larvae survived. The highest survival and growth was 85% in supplemented DMEM. The final average length of larvae in supplemented media exceeded the initial one. There were

Contribución de las autoras:
Luz Elena Velásquez: consecución de moluscos y larvas de nematodos
Todas las autoras participaron en el diseño metodológico, el procesamiento de moluscos y las larvas de nematodos, la estandarización de la técnica de cultivo, el análisis de datos y la escritura del manuscrito.

significant differences between the average length of larvae cultured in supplemented media and the initial length. The initial width of larvae did not change.
Conclusions: The best medium for the culture of L_3 larvae was supplemented DMEM. The length provided more information than the width for the larval growth evaluation. The larvae studied did not correspond to *Angiostrongylus cantonensis*, *A. costaricensis* or *Aelurostrongylus abstrusus*.

Key words: Nematoda; snails; culture media; *in vitro* techniques; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3408

Los nematodos parásitos de la súperfamilia Metastrongyloidea son de ciclo indirecto. Por lo general, sus huéspedes intermediarios son caracoles, en los cuales entran en el estadio larval 1 (L_1) cuando estos se comen las heces de vertebrados parasitados. En el molusco, las larvas cambian a L_2 y luego a L_3, estadio en el que tienen la capacidad de infectar a los vertebrados que las ingieren en alimentos contaminados o al consumir el tejido crudo o mal cocido de los caracoles que las portan (1-3).

En Colombia, los registros de pacientes infectados con nematodos patógenos transmitidos por moluscos son muy escasos (4). Sin embargo, en la actualidad, los habitantes de 29 departamentos del país se encuentran en riesgo de sufrir nematodosis relacionadas con la presencia del caracol invasor africano *Lissachatina (=Achatina) fulica* (Bowdich, 1822) (5,6). Este es un molusco terrestre originario del oriente de África, con registros en Argentina, Bolivia, Brasil, Ecuador, Paraguay, Perú y Venezuela. Además, está presente en Asia, Europa, Norteamérica y Oceanía (7-9).

En África, Brasil, Ecuador y en algunas islas del Pacífico, se ha demostrado que *L. fulica* representa un riesgo para la salud humana, ya que funge como huésped intermediario de nematodos de la superfamilia Metastrongyloidea, como *Angiostrongylus cantonensis*, agente etiológico de la meningoencefalitis eosinofílica, enfermedad zoonótica endémica en países asiáticos. Además, en Brasil es vector de *Angiostrongylus vasorum,* parásito originario de Europa que afecta principalmente a los perros, y de *Aelurostrongylus abstrusus,* un nematodo patógeno para gatos y perros domésticos (10-14).

En Antioquia, el primer hallazgo de este caracol tuvo lugar en enero del 2012, en el municipio de Santa Fe de Antioquia (15). En estudios parasitológicos de *L. fulica* provenientes de Santa Fe de Antioquia, se pudo demostrar la presencia abundante y frecuente de larvas L_3 (16), así como la riqueza de morfotipos al analizar los helmintos en caracoles africanos procedentes de otras regiones de Colombia. El tiempo de vida de las larvas en el laboratorio es muy corto, lo que exige jornadas de trabajo largas, intensas y agotadoras.

La posibilidad de disponer de formas larvarias de organismos de interés potencial en salud mediante su cultivo en laboratorio, ha permitido recopilar información sobre los cambios morfológicos de los helmintos, la relación entre huésped y parásito, las necesidades nutricionales de los parásitos y su organización estructural. Además, ha hecho posible la evaluación de antihelmínticos, la producción de vacunas y otras herramientas útiles en los programas para la prevención y el manejo de las nematodosis (17-20).

En este contexto, en el presente estudio se propuso estandarizar el cultivo *in vitro* de larvas L_3 en caracoles africanos de Santa Fe de Antioquia, con el fin de aumentar el tiempo de vida de los helmintos en el laboratorio y facilitar, así, las observaciones, mejorar la calidad de vida del personal encargado de los análisis y allanar el camino hacia futuras investigaciones.

Materiales y métodos

Recolección de los caracoles

Entre julio y noviembre de 2014, se recolectaron ejemplares de *A. fulica*, observando las medidas de protección necesarias (guantes y tapabocas), en el municipio de Santa Fe de Antioquia, localizado a 06° 33’ 682’’ N y 75° 49’ 746’’ O. Posteriormente, los ejemplares fueron trasladados por separado al Laboratorio de Malacología Médica y Tremátodos del PECET en la Universidad de Antioquia.

Sacrificio de los caracoles

En el laboratorio se midieron los caracoles y se los adormeció. Se quebró la concha de cada ejemplar y se retiró la parte blanda, la cual se cortó en trozos,

Correspondencia:
Luz Elena Velásquez, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Calle 62 N° 52-59, torre 2, laboratorio 730, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 219 6514; fax (574) 219 6511
luzelena333@yahoo.com

Recibido: 13/09/16; aceptado: 24/10/17

se depositó en un vaso de precipitación, se cubrió con HCl al 0,7 % y se dejó en reposo durante seis horas (12,14).

Recuperación de las larvas

El contenido de cada vaso se depositó en un embudo siguiendo el método de Baermann. Se dejó en reposo durante 18 horas para permitir la migración de las larvas y, posteriormente, se recolectaron 15 ml del líquido en un tubo Falcon. La porción recolectada se dejó sedimentar durante 40 minutos, aproximadamente (18,19).

El contenido del tubo Falcon se observó con un estereomicroscopio Nikon SMZ445™ para recuperar las larvas con una pipeta Pasteur. Las larvas se extrajeron, se contaron y se depositaron en una caja de Petri con agua del grifo, y, posteriormente, se lavaron tres veces con suero fisiológico. Se midieron diez de las larvas, 140 se sembraron en los medios de cultivo seleccionados y diez se fijaron en alcohol al 96 % para su futuro estudio molecular.

Medios de cultivo

Las larvas se sembraron en tres medios de cultivo: Schneider, DMEM y RPMI, sin suplemento de SFB al 20 % y con este. Como medio de control se usó agua destilada más SFB al 20 %.

Para reducir la contaminación de los medios de cultivo, antes de sembrar las larvas, los platos de 12 pozos, las pipetas, las puntas, los tapabocas y los guantes se introdujeron en una cámara de bioseguridad y se irradiaron con luz ultravioleta durante 20 minutos.

Siembra de las larvas

La zona de trabajo se limpió con alcohol al 96 % y se mantuvieron los mecheros encendidos. Para cada medio de cultivo y para el control, se acondicionaron cuatro pozos del plato de ELISA, cada uno con un mililitro del medio de cultivo y cinco larvas. El volumen del medio de cultivo se midió con una micropipeta automática y las larvas se sembraron con una pipeta Pasteur. Los platos se incubaron en una estufa Memmert 854 Schwabach™ a 37 °C durante 36 días. El medio de cultivo de las larvas se cambió cada 36 horas. En cada ocasión se observó el protocolo de desinfección descrito.

Medición de las larvas

Para evaluar las diferencias en el crecimiento de las larvas, se midieron la longitud y la anchura iniciales de 10 de los ejemplares y, a los 36 días, se midieron de nuevo en 10 larvas de cada medio de cultivo y del control.

Las larvas se midieron en un microscopio Nikon Eclipse E200™, con una reglilla ocular en los objetivos de 10X y 40X. También, se observaron las características morfológicas y se obtuvieron imágenes con una cámara Sony Cyber-shot Carl Zeiss™, modelo DSC-W35.

Análisis estadístico

Para las variables de anchura y longitud de las larvas cultivadas en los diferentes medios, se calcularon el promedio, la desviación estándar, el valor máximo y el valor mínimo. Se hizo una gráfica de caja de bigotes para comparar la anchura y la longitud de las larvas en cada medio de cultivo.

Se hizo una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Se comparó el promedio de la longitud y de la anchura de las larvas cultivadas en cada medio con las mediciones iniciales mediante una prueba t de Student. Se asumió como significativo un valor de p menor de 0,05.

Los valores de las mediciones se registraron en Microsoft Excel 2010™ y los análisis estadísticos se hicieron con el programa SPSS™, versión 18 (Chicago, Illinoins, USA), licencia amparada por la Universidad de Antioquia.

Consideraciones éticas

Este proyecto obtuvo el aval del Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia.

Resultados

Se cultivaron 140 larvas durante 36 días, de las cuales sobrevivió el 50 % (70). En DMEM sobrevivieron ocho larvas (40%), en Schneider, nueve (45 %), en RPMI, 12 (60 %), en Schneider más SFB al 20 %, diez (50 %), en RPMI más SFB al 20 %, 14 (70%) y en DMEM más SFB al 20 %, 17 (85 %). Las larvas de control solo sobrevivieron diez días.

En cuanto a la morfología de las larvas, al inicio del ensayo se observaron la cutícula externa, el esófago filiforme seguido del bulbo esofágico y la apertura cloacal cerca de la cola, la cual es larga y termina en punta (figura 1). Las dimensiones de estas larvas se presentan en el cuadro 1; allí se evidencia que fueron diferentes a las registradas en las larvas L_3 de *Angiostrongylus cantonensis*, *A. costaricensis* y *A. abstrusus* (21,22).

Las larvas con 36 días en el medio de cultivo conservaron las características morfológicas de la larva inicial, aunque difirieron por la presencia de puntos pigmentados a lo largo del cuerpo (figura 2).

En la figura 3 y el cuadro 2, se observa que las larvas cultivadas en los medios con SFB alcanzaron una longitud promedio mayor que las cultivadas en los medios sin SFB. Asimismo, se aprecia que las larvas cultivadas en DMEM más SFB al 20 % presentaron la mayor longitud promedio, en tanto que la menor se obtuvo en las larvas cultivadas en RPMI. El promedio de la anchura de las larvas en los medios de cultivo evaluados fue similar al registro inicial.

El test de normalidad demostró que los datos tenían una distribución normal, ya que, en general, todos correspondieron al promedio o fueron cercanos.

En el cuadro 3 se evidencia que hubo diferencias estadísticas entre el promedio de la longitud de las larvas cultivadas en los medios con suplementos y el promedio de la longitud inicial, lo que indica que dichos medios favorecieron el crecimiento de las larvas. No hubo diferencias estadísticas entre la anchura de las larvas cultivadas y la anchura inicial (no se presentan los datos).

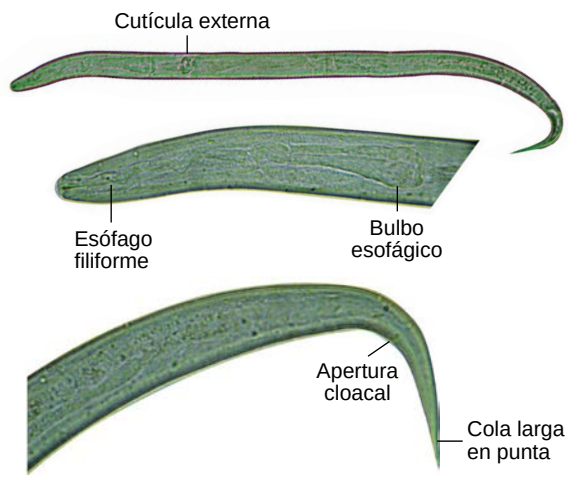

Figura 1. Morfología de la larva al inicio del experimento

Discusión

Las diferencias en algunos caracteres morfológicos y en las dimensiones de las larvas L_3 objeto de este estudio, sugieren que no correspondían a las L_3 de *A. cantonensis*, *A. costaricensis* ni *A. abstrusus* (21,22).

Todos los medios de cultivo evaluados permitieron que las larvas sobrevivieran por 36 días, destacándose el DMEM más SFB al 20 %, con una supervivencia de 85 %. Se obtuvieron resultados similares al cultivar larvas L_3 de *A. cantonensis* durante cuatro semanas en los medios RPMI 1640, NCTC 135, medio de Waymouth MB 752/1 (WYM) y medio mínimo esencial de Eagle (MEM) con SFB al 20 %; en este caso, también se destacó el MEM más SFB al 20 %, con una supervivencia de 87 % (23). En ese mismo estudio, el medio de cultivo sin suplemento más favorable para la supervivencia de las larvas fue el RPMI (57 %), resultado similar al obtenido en el presente experimento (60 %).

En el presente estudio se demostró que el DMEM con SFB al 20 % es el medio de cultivo más adecuado para el cultivo *in vitro* de las L_3 obtenidas en ejemplares de *L. fulica* en Santa Fe de Antioquia, pues con él hubo un mayor incremento en la longitud de las larvas y un mayor porcentaje de supervivencia. Sin embargo, la anchura de los especímenes no aumentó. Este resultado es congruente con el reseñado para el cultivo de larvas L_3 de *A. cantonensis* en MEM con SFB al 20 %, en el cual las larvas incrementaron su longitud al cabo de 36 días, mas no su anchura, y pasaron al estadio de L_4 (19), evento este que no se observó durante el presente ensayo, posiblemente porque las larvas correspondían a una especie diferente de nematodo, cuyas necesidades son otras.

Cuadro 1. Dimensiones estimadas en larvas L_3 de *Angiostrongylus cantonensis*, *A. costaricensis*, *Aelurostrongylus abstrusus* y larvas L_3 sin identificar, obtenidas de ejemplares de *Lissachatina fulica* recolectados en Santa Fe de Antioquia. Todas las medidas están en micras (µm).

Características	*Angiostrongylus cantonensis*	*Angiostrongylus costaricensis*	*Aelurostrongylus abstrusus*	Larvas L_3 (iniciales) recolectadas en Santa Fe de Antioquia
Longitud (µm)	425-524	400-500	459-568	572-680
Anchura (µm)	23-34	20-30	26-34	20-29
Longitud del esófago (µm)	167-194	170	194-221	142-175
Poro excretor hasta la parte anterior (µm)	78-105	80-110	88-102	No se observó
Longitud del extremo posterior (µm)	34-44	30-40	34-44	48-57
Terminación de la cola (µm)	Punta fina	Indentación dorsal	Pomo redondo	Punta fina

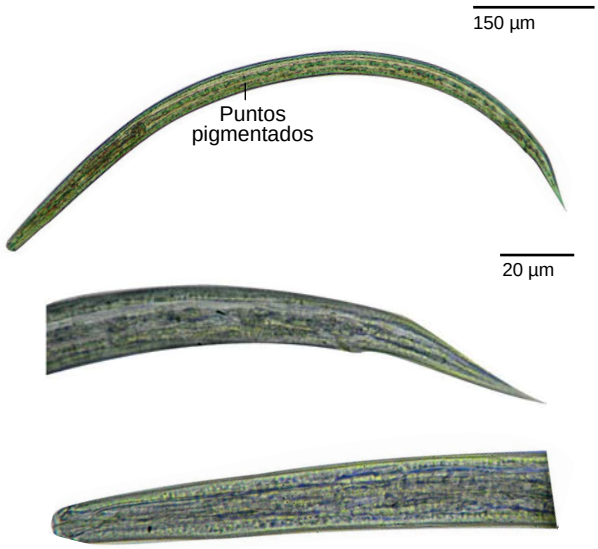

Figura 2. Morfología de la larva cultivada. Fotografía de Nelly Solfania Heredia. Laboratorio de Malacología Médica y Tremátodos. Microscopio Nikon Eclipse E200®, 10X y 40X.

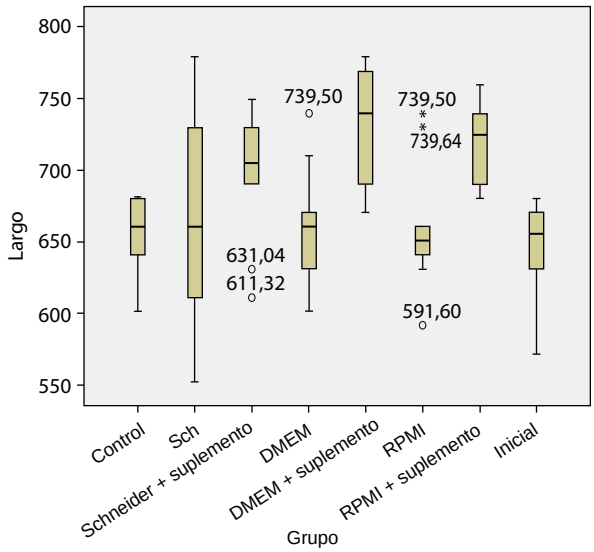

Figura 3. Comportamiento de los datos y promedios de la longitud (µm) de las larvas en los diferentes medios con respecto a la media inicial

Cuadro 2. Promedio, desviación estándar, valor mínimo y valor máximo de la longitud de las larvas de Metastrongiloidea cultivadas durante 36 días en tres medios con SFB y sin este

		Promedio (µm)	Desviación estándar (µm)	Valor mínimo (µm)	Valor máximo (µm)
	Medidas iniciales	645,83	31,94	571,88	680,30
Medios de cultivo	Control	654,70	27,18	601,46	680,34
	Schneider	666,54	73,08	552,16	778,94
	DMEM	661,61	40,64	601,46	739,50
	RPMI	659,63	44,20	591,60	739,50
	DMEM más SFB al 20 %	732,65	42,02	670,72	778,94
	RPMI más SFB al 20 %	718,79	27,28	680,34	759,22
	Schneider más SFB al 20 %	696,12	43,40	611,32	749,36

Cuadro 3. Diferencia del promedio de la longitud y la anchura iniciales en µm de las larvas en relación con el promedio final en los medios probados con SFB y sin este

Comparación	t de Student	p
Longitud		
Inicial *Vs.* control	0,669	0,512
Inicial *Vs.* Schneider	0,821	0,422
Inicial *Vs.* Schneider más suplemento	2,951	0,009
Inicial *Vs.* DMEM	0,965	0,348
Inicial *Vs.* DMEM más suplemento	5,202	0,000
Inicial *Vs.* RPMI	0,801	0,435
Inicial *Vs.* RPMI más suplemento	5,493	0,000
Ancho		
Inicial *Vs.* control	-1,599	0,127
Inicial *Vs.* Schneider	-0,375	0,712
Inicial *Vs.* Schneider más suplemento	0,187	0,854
Inicial *Vs.* DMEM	-2,305	0,037
Inicial *Vs.* DMEM más suplemento	-0,166	0,870
Inicial *Vs.* RPMI	-0,338	0,740
Inicial *Vs.* RPMI más suplemento	-0,309	0,761

En principio, los resultados obtenidos en el medio DMEM con SFB al 20 % posibilitaron el cultivo de los diversos morfotipos de L_3 obtenidos en *L. fulica*, con lo que fue posible comparar sus reacciones en el desarrollo morfológico, el crecimiento y la supervivencia e, incluso, experimentar con el incremento del tiempo de las larvas en el medio para propiciar su paso al estadio L_4. Además, se pudieron planear jornadas de trabajo menos exigentes y agobiantes para los investigadores encargados de los helmintos.

El cultivo *in vitro* de las larvas L_3 en DMEM con SFB al 20 % permitirá emplear nuevos enfoques en los estudios sobre los nematodos que se encuentran en *L. fulica* en Colombia, donde la diversidad de parásitos es un reto que apenas se comienza a vislumbrar y que exige establecer su identidad, y desarrollar herramientas diagnósticas y de eliminación de helmintos, entre otras.

Agradecimientos

A Jessika López, por su valiosa colaboración en el diseño experimental y el análisis estadístico. A Mercedes Villa Lloberas, de la Universidad de Barcelona, por sus sugerencias. A Iván Darío Vélez Bernal, director del PECET, por facilitar los equipos y el espacio físico para realizar la investigación.

Conflicto de intereses

No existe ningún conflicto de intereses.

Financiación

Este proyecto fue financiado con recursos del CODI-Universidad de Antioquia en el marco del proyecto "Identificación taxonómica de *Achatina fulica* y obtención de nematodos del molusco invasor en seis departamentos de Colombia", código 222-CIEMB-096-13, y del proyecto de Regalías - Gobernación de Antioquia, código 46 0000 10 73.

Referencias

1. **Wang Q, Wu D, Wei J, Owen R, Lun Z.** Human *Angiostrongylus cantonensis*: An update. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:389-95. https://doi.org/10. 1007/s10096-011-1328-5
2. **De Oliveira A, Torres E, Maldonado J, de Barros J, Fernandez M, Thiengo S.** *Achatina fulica* como hospedeiro intermediário de nematódeos de interesse médico-veterinário em Goiás, Brasil. Rev Pat Trop. 2010;39:199-210.
3. **Fontanilla I.** *Achatina* (*Lissachatina*) *fulica* Bowdich: Its molecular phylogeny, genetic variation in global populations, and its possible role in the spread of the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* (CHEN) (tesis). Nottingham: University of Nottingham; 2010.
4. **Rodríguez G.** Hematoquecia letal por angiostrongilosis abdominal. Biomédica. 2000;20:120-30. https://doi.org/10.7705/biomedica.v20i2.1055
5. **De La Ossa A, Carlos J, Lasso A.** Registro del caracol africano gigante *Achatina fulica* (Bowdich 1822) (Mollusca: Gastropoda-Achatinidae) en Sincelejo, costa Caribe de Colombia. Biota Colombiana. 2012;13:247-52.
6. **Linares E, Avendaño J, Martínez A, Rojas A.** El caracol gigante africano, un visitante indeseado. Miniguía de campo. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2013.
7. **Vogler RE, Beltramino AA, Sede MM, Gregoric DE, Núñez V, Rumi A.** The giant African snail, *Achatina fulica* (Gastropoda: Achatinidae): Using bioclimatic models to identify South American areas susceptible to invasion. Amer Malac Bull. 2013;31:39-50. https://doi.org/10.4003/006.031.0115
8. **Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas.** Sistema de Prevención, Monitoreo y Control del Caracol Gigante Africano (*Achatina fulica*). Fecha de consulta: 9 de enero de 2015. Disponible en: http://www.sinavimo.gov.ar/pagina/sistema-de-prevencion-monitoreo-y-control-del-caracol-gigante-africano-achatina-fulica
9. **Fontanilla IK, Sta María IM, García J, Ghate H, Naggs F, Wade C.** Restricted genetic variation in populations of *Achatina (Lissachatina) fulica* outside of East Africa and the Indian Ocean Islands points to the Indian Ocean Islands as the earliest known common source. PLoS One. 2014;9: e105151. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105151
10. **Thiengo S, Maldonado A, Mota E, Torres E, Caldeira R, Carvalho O, *et al.*** The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. Acta Trop. 2010;115:194-9. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.01.005
11. **Contreras A, Núñez F, Pérez O, Lastre M, Magraner M, Bu-Coifiu R, *et al.*** Peculiaridades de la meningoencefalitis por *Angiostrongylus cantonensis* en América. Rev Neurol. 2007;45:755-63.
12. **Maldonado A, Simoes R, Oliveira A, Motta E, Fernandez M, Pereira Z, *et al*.** Firts report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105: 938-41. https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000700019
13. **Coaglio Silva LA.** Susceptibilidade e comportamento de *Achatina fulica* infectada com *Angiostrongylus vasorum* (tesis). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2013.
14. **Thiengo S, Fernandez M, Torres E, Coelho P, Lanfredi R.** First record of a nematode Metastrongyloidea (*Aelurostrongylus abstrusus* larvae) in *Achatina (Lissachatina) fulica* (Mollusca, Achatinidae) in Brazil. J Inverteb Pathol. 2008;98: 34-9. https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.10.010
15. **Corantioquia.** Un peligroso caracol gigante africano nos invade. Santa Fe de Antioquia. Fecha de consulta: 9 de noviembre de 2014. Disponible en: http://nuevoportal.corantioquia.gov.co/Lists/Noticias%20Izquierda/Detalle.aspx?ID=3&ContentTypeId=0x010400852056182E12584AA4A86AF5CD531A56
16. **Corantioquia.** Informe final del Convenio Nº 792 de 2012, suscrito entre la Universidad de Antioquia y la Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia. Medellín: Corantioquia; 2014. p. 78.
17. **Smyth JD.** *In vitro* cultivation of parasitic helminths. Boca Ratón: CRC Press; 1990. p. 1-144.
18. **Yasuraoka K, Hata H.** *In vitro* cultivation of parasitic helminths. Prog Med Parasitol Jpn. Tokyo: Meguro Parasitological Museum; 2003. p. 211-26.
19. **Lin R, He J, Chung L, Lee J, Wang J, Yen C.** *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongiloidea): *In vitro* cultivation of infective third-stage larvae to fourth-stage larvae. PLoS One. 2013;8:e72084. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072084
20. **Ahmed N.** Cultivation of parasites. Trop Parasitol. 2014;4: 80-9. https://doi.org/10.4103/2229-5070.138534
21. **Ash LR.** Diagnostic morphology of the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus*, and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). J Parasitol. 1970;56:249-53. https://doi.org/10.2307/3277651
22. **Thiengo SC, Vicente JJ, Pinto RM.** Redescription of *Angiostrongylus* (*Paranstrongylus*) *costaricensis* Morera & Céspedes (Nematoda: Metastrongyloidea) from Brazilian strain. Rev Bras Zool. 1997;14:839-44. https://doi.org/10.1590/S0101-81751997000400008
23. **Hata H.** *In vitro* cultivation of the third and fourth stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. J Vet Med Sci. 1993;55:345-7. https://doi.org/10.1292/jvms.55.345

Biomédica 2018;38:30-6
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3677

ARTÍCULO ORIGINAL

Detección molecular de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. y *Brucella* spp. en queso artesanal fresco comercializado en Barranquilla: un estudio piloto

Zamira E. Soto-Varela[1], Clara Gilma Gutiérrez[1], Yurina de Moya[1], Ramón Mattos[2], Hernando José Bolívar-Anillo[3], José Luis Villarreal[4]

[1] Grupo de Investigación en Gestión Ecológica y Agroindustrial, Programa de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Libre, Barranquilla, Colombia
[2] Grupo de Investigación en Métodos Estadísticos Aplicados, Universidad Libre, Barranquilla, Colombia
[3] Grupo de Investigación de Biomembranas, Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Libre, Barranquilla, Colombia
[4] Grupo de Investigación en Bioquímica Patológica, Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Libre, Barranquilla, Colombia

Introducción. Cada año mueren, aproximadamente, tres millones de personas como consecuencia de las enfermedades transmitidas por alimentos. El queso artesanal fresco que se produce y distribuye en la región Caribe colombiana es un producto autóctono de los departamentos de Córdoba, Sucre, Bolívar, Atlántico, Magdalena, Cesar y La Guajira. Su consumo masivo aumenta el riesgo de infección con salmonelosis, listeriosis y brucelosis debido a que es elaborado con una tecnología muy rústica, con leche de vaca no pasteurizada, sin procedimientos estandarizados e higiénicos, y a que su almacenamiento no es adecuado.
Objetivo. Detectar la presencia de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. y *Brucella* spp. en muestras de queso artesanal costeño fresco procedente de los departamentos de la región Caribe colombiana.
Materiales y métodos. Mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), se analizaron 27 muestras de queso proveniente de cinco departamentos de la región Caribe: Atlántico (n=6), Bolívar (n=2), Córdoba (n=1), Magdalena (n=16) y Sucre (n=2). Del total de las muestras, 17 eran de queso blando, cinco de queso semiduro y cinco de queso duro.
Resultados. En el 62,9 % de las muestras se detectó *Salmonella* spp. (17/27), en el 70,4 %, *Listeria* spp. (19/27), y en el 22,2 %, *Brucella* spp. (6/27). Las muestras provenían principalmente del departamento del Magdalena y, en 62,5 % (10/16) de ellas, se encontró *Salmonella* spp. y *Listeria* spp., en tanto que en el 50 % (3/6) de las muestras del departamento del Atlántico se detectó *Brucella* spp.
Conclusión. Los resultados evidenciaron la presencia de estos microorganismos en todas las muestras de queso costeño blando.

Palabras clave: *Salmonella*; *Listeria*; *Brucella*; enfermedades transmitidas por los alimentos/epidemiología; reacción en cadena de la polimerasa; queso.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3677

Molecular detection of *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Brucella* spp. in fresh artisanal cheese marketed in the city of Barranquilla: A pilot study

Introduction: Each year approximately 3 million people die as the result of foodborne diseases. The fresh artisan (handmade) cheese produced and distributed in the Colombian Caribbean region is a native product from the departments of Córdoba, Sucre, Bolívar, Atlántico, Magdalena, Cesar, and La Guajira. Its mass consumption increases the risk of infection with *Salmonella* spp., *Listeria* spp., and *Brucella* spp., as it is made with a very rustic technology, with unpasteurized cow milk, without standardized and hygienic procedures and its storage is inadequate.
Objective: To detect the presence of *Salmonella* spp., *Listeria* spp., and *Brucella* spp. in samples of fresh artisan cheese from the Colombian Caribbean region.

Contribución de los autores:
Zamira E. Soto-Varela: desarrollo de protocolos de laboratorio, evaluación de la calidad metodológica, procesamiento y análisis de datos y redacción del artículo
Clara Gilma Gutiérrez: búsqueda de la literatura, clasificación y revisión de información y redacción del artículo
Yurina de Moya: desarrollo de protocolos de laboratorio y redacción del artículo
Hernando José Bolívar-Anillo: toma de muestras, revisión y redacción del artículo
Ramón Mattos: evaluación de la calidad metodológica, análisis de datos y apoyo en la discusión
José Luis Villarreal: revisión de los protocolos de laboratorio, interpretación de resultados, revisión y redacción del artículo

Materials and methods: Twenty-seven samples of cheese from five departments of the Caribbean Region (Atlántico (n=6), Bolívar (n=2), Córdoba (n=1), Magdalena (n=16), and Sucre (n=2)) were analyzed by real-time polymerase chain reaction (qPCR). Seventeen of the samples corresponded to soft cheese, five to semi-hard cheese and five to hard cheese.
Results: In 62.9% (17/27) of the samples we detected *Salmonella* spp., in 70.4% (19/27), *Listeria* spp., and in 22.2% (6/27), *Brucella* spp., mainly from the department of Magdalena. In 62.5% (10/16) of the samples we detected *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. while in the department of Atlántico, 50% (3/6) of the samples corresponded to *Brucella* spp.
Conclusion: The results confirmed the presence of these microorganisms in all the samples of soft cheese from the Colombian Caribbean region.

Keywords: *Salmonella*; *Listeria*; *Brucella*; foodborne diseases/epidemiology; polymerase chain reaction; cheese.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3677

A pesar de los estrictos controles que se imponen a la industria alimentaria, cada año mueren, aproximadamente, tres millones de personas como consecuencia de enfermedades transmitidas por alimentos (1,2), siendo la causa principal el consumo de agua o alimentos contaminados (3,4). Se han descrito más de 250 enfermedades transmitidas por alimentos (5), lo que exige llevar a cabo controles microbiológicos y sanitarios cada vez más estrictos durante los procesos de producción de alimentos.

Según la Norma General del *Codex Alimentarius*, el queso fresco se define como el producto higienizado sin madurar que está listo para el consumo después de su elaboración. El queso se clasifica según su consistencia, es decir, el valor correspondiente al porcentaje de humedad sin materia grasa, en extraduro, duro, firme semiduro y blando (6,7). El queso que se produce y distribuye en la región Caribe colombiana es un producto autóctono de los departamentos de Córdoba, Sucre, Bolívar, Atlántico, Magdalena, Cesar y La Guajira. Se elabora con leche de vaca no pasteurizada utilizando una tecnología muy rústica y se somete a un periodo de salado de dos horas para prensarlo posteriormente; es de color blanco y no es madurado ni ácido. El procedimiento para su elaboración no está estandarizado ni responde a las normas higiénicas y, además, el almacenamiento del producto no es adecuado (8,9).

Dado su consumo masivo, el riesgo de listeriosis, salmonelosis y brucelosis, producidas por *Listeria monocytogenes* y microorganismos de los géneros *Salmonella* spp. y *Brucella* spp., es alto. Dichas infecciones hacen parte de las enfermedades transmitidas por alimentos, cuyo impacto en la salud pública es innegable (10-12).

La transmisión de *Brucella* spp. puede darse por contacto directo con secreciones de animales infectados (13) o, indirectamente, por el consumo de productos lácteos no pasteurizados (14). Sin embargo, los reportes de transmisión de persona a persona de *Brucella* spp. son escasos (15), en tanto que *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* se transmiten principalmente por la ingestión de alimentos contaminados. El desarrollo de estas enfermedades depende de varios factores, como la patogenia del microorganismo, la dosis infecciosa y el estado de salud del consumidor (16).

El objetivo de este trabajo fue detectar mediante qPCR *Salmonella* spp., *Listeria* spp. y *Brucella* spp. en quesos artesanales procedentes de los departamentos de la costa Atlántica colombiana que se distribuyen en expendios de Barranquilla.

Materiales y métodos

Tipo de estudio

Se hizo un estudio de tipo descriptivo y transversal.

Origen y características de los quesos

Se encontraron 27 expendios en la base de datos de la Secretaría de Salud de Barranquilla. Esta información se complementó buscando en el directorio telefónico y mediante un sondeo directo. Diecisiete de los expendios aceptaron participar. El origen y el tipo de los quesos expendidos en la ciudad, se determinaron entrevistando a los distribuidores mediante una encuesta estructurada en la cual se clasificaba el tipo de queso en blando, semiduro y duro, y se consignaba su procedencia y el volumen de queso acopiado para la venta.

Correspondencia:
Clara Gutiérrez, Grupo de Investigación en Gestión Ecológica y Agroindustrial, Programa de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Libre, km 7 antigua vía Puerto Colombia, Barranquilla, Colombia
Teléfono: (300) 621 3019; fax: 359 8567
clarag.gutierrezc@unilibre.edu.co; clara_tierra@yahoo.es

Recibido: 21/11/16; aceptado: 02/11/17

Muestreo de los quesos frescos

Mediante un muestreo no probabilístico entre los meses de enero y mayo del 2013, se recolectaron muestras de queso costeño fresco en 17 expendios mayoristas de Barranquilla, y se tomaron 27 muestras. Los expendios incluidos vendían queso costeño fresco producido en la costa Caribe colombiana y sus distribuidores aceptaron participar libremente en el estudio mediante consentimiento informado. De cada muestra se tomaron 100 g que fueron procesados en el Laboratorio de Investigación de la Universidad Libre de Barranquilla.

Extracción, purificación y cuantificación del ADN

Se pesaron 25 g de cada muestra y se homogenizaron en 225 ml de agua con peptona al 0,1 % en un equipo Stomacker 400 Circulator™ (Seward Ltd.) a 260 rpm durante 30 segundos.

Con el propósito de permitir que las partículas sólidas en suspensión se decantaran, los homogenizados permanecieron a temperatura ambiente durante dos horas y, posteriormente, se mezclaron 500 µl del sobrenadante con 200 µl de la solución tampón TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). En la lisis celular se emplearon 10 mg/m con pH 8,0 de lisozima A y 0,5 % v/v de dodecilsulfato sódico (SDS). La mezcla se incubó durante 90 minutos a 37 °C.

Para eliminar los péptidos y lípidos residuales, se adicionaron 80 µl de una solución de 5 M de cloruro de sodio (NaCl) más 100 µl de 3M de acetato de amonio y se incubó nuevamente durante 10 minutos a 65 °C. La suspensión resultante se trató con una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1), y el sobrenadante se tomó para una segunda purificación con cloroformo y alcohol isoamílico (24:1).

El ADN se sometió a precipitación con isopropanol frío durante 30 minutos y, posteriormente, se lavó con etanol al 70 %. Después de la evaporación del etanol, se hidrató con 20 µl de agua libre de desoxirribonucleasas (DNasa) y ribonucleasas (RNasa). La pureza y concentración del ADN se determinaron en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c™ de Thermo Scientific, Waitham, MA, USA (17,18).

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La amplificación mediante qPCR para la detección del género *Salmonella* spp. se realizó con el estuche comercial iQ-Check Bio-Rad Salmonella II™, la del género *Listeria* spp., con el estuche comercial iQ-Check *Listeria* spp.™ (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante, y la de *Brucella* spp., con el estuche comercial Quantification of *Brucella* genus (all species)™ (PrimerDesign, Ltd.), el cual emplea una sonda TaqMan™ leída en el canal FAM.

Se preparó la mezcla de reacción siguiendo las indicaciones del fabricante para un volumen final de 25 µl, con una concentración de ADN de 150 ng. El protocolo de amplificación se llevó a cabo con el estuche CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System™ (Bio-Rad, Hercules, California) en un termociclador C-1000™.

En todas las muestras se agregó un control interno en el momento de la lisis celular durante la extracción del ADN, el cual se amplificó conjuntamente con el ADN de la muestra utilizando otra sonda TaqMan™ detectada en el canal VIC. En cada ensayo se incluyeron los respectivos controles positivos, negativos y los blancos, según las instrucciones del fabricante.

Análisis de resultados

El porcentaje de muestras positivas para los géneros *Salmonella, Listeria* y *Brucella* se determinó mediante el cociente entre el número de muestras positivas y el número total de muestras multiplicado por 100. El cálculo se hizo considerando como unidad de muestreo el expendio y, como unidad objeto de análisis, el tipo de queso.

Resultados

Origen y características de los quesos

Según la encuesta aplicada, el queso distribuido en expendios mayoristas de Barranquilla procedía de 36 municipios y corregimientos de la región Caribe colombiana. El departamento del que provenía la mayor parte (58 %) de este producto fue Magdalena. Los departamentos de Atlántico y Bolívar aportaron 19 y 14 %, respectivamente. Los departamentos con los menores porcentajes fueron Sucre (6 %) y Córdoba (5 %). Los volúmenes distribuidos oscilaban entre 50 y 2.000 kg por día. En cuanto al tipo de queso, el de mayor distribución fue el queso blando (58 %), en tanto que los quesos semiduro y duro registraron un porcentaje de 21 % cada uno.

Características de los quesos frescos analizados

Los porcentajes de muestras positivas para *Salmonella* spp*., Listeria* spp. y *Brucella* spp. fueron de 63 % (17/27), 70,4 % (19/27) y 22,2 %

(6/27), respectivamente. De las 27 muestras recolectadas, 17 (63 %) eran de queso blando, 5 (18,5 %) de queso semiduro y 5 (18,5 %) de queso duro.

Once de 17 (64,7 %) muestras de queso blando fueron positivas para *Salmonella* spp., 13 de 17 (76,5 %) lo fueron para *Listeria* spp. y 6 de 17 (35,3 %) para *Brucella* spp., es decir, el total de muestras positivas para *Brucella* spp. en este estudio, se encontraron en queso blando. Tres de las muestras fueron positivas simultáneamente para los tres microorganismos. En cuatro de las 27 muestras analizadas, las cuales fueron positivas para *Brucella* spp. (sin determinar), no se logró la amplificación del control interno.

Cuatro de 5 (80 %) de las muestras de queso duro fueron positivas para *Salmonella* spp., 3 de 5 (60 %) para *Listeria* spp. y ninguna fue positiva para *Brucella* spp., en tanto que 2 de 5 (40 %) muestras de queso semiduro fueron positivas para *Salmonella* spp., 3 de 5 (60 %) para *Listeria* spp. y ninguna para *Brucella* spp.

Porcentaje de muestras positivas para Salmonella spp.*, Listeria* spp. y *Brucella* spp. *por departamento de procedencia del queso*

De las muestras de quesos procedentes de Atlántico, 3 de 6 (50 %) fueron positivas para *Salmonella* spp., 4 de 6 (66,6 %) para *Listeria* spp. y 3 de 6 (50 %) para *Brucella* spp. De las de quesos procedentes del Magdalena, 10 de 16 (62,5 %) fueron positivas para *Salmonella* spp., 10 de 16 (62,5 %) para *Listeria* spp. y 2 de 16 (12,5 %) para *Brucella* spp. Las dos muestras de quesos procedentes de Bolívar fueron positivas para *Salmonella* spp. y para *Listeria* spp., y una de ellas para *Brucella* spp.

En las muestras de los quesos de Córdoba y Sucre, no se encontró *Brucella* spp., pero la única muestra de Córdoba fue positiva para *Salmonella* spp. y *Listeria* spp.; las dos muestras de quesos provenientes de Sucre fueron positivas para *Listeria* spp., pero solo una lo fue para *Salmonella* spp. (cuadro 1).

Discusión

En Barranquilla confluyen varias rutas de comercialización del queso costeño proveniente de los departamentos del Caribe colombiano, principalmente de Magdalena, que en este estudio aportó más del 50 % del queso distribuido en la ciudad, en tanto que Sucre y Córdoba tuvieron una participación menor en dicha comercialización, aunque son departamentos con una alta prevalencia de brucelosis en los hatos lecheros (19).

En el presente estudio se reporta la presencia de *Brucella* spp. en quesos distribuidos en Barranquilla. Este agente patógeno se ha encontrado previamente en las etapas de producción primaria de leche en otras ciudades de Colombia (20,21). En el estudio se reconfirmó, además, la presencia de *Salmonella* spp. (22,23) en quesos artesanales distribuidos en el Caribe colombiano y de *Listeria* spp. en queso costeño. Como en el caso de *Brucella* spp., este último patógeno se ha encontrado anteriormente en la materia prima para la elaboración de los quesos (24). Puede concluirse, entonces, que en Barranquilla el consumo de queso costeño estaría asociado con el riesgo de contagio por *Salmonella* spp. y *Brucella* spp.

Sin embargo, el riesgo también debe asociarse con la viabilidad de las bacterias en el alimento y el tipo de queso costeño consumido. El tiempo de supervivencia de los microorganismos en el queso depende del proceso de elaboración y de factores como la concentración de sal, el pH, las condiciones de maduración y las cepas bacterianas empleadas en la transformación de la leche (25).

En este estudio se encontró ADN de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. y *Brucella* spp. simultáneamente en tres muestras de queso fresco costeño blando, lo cual coincide con lo reportado en otros estudios en los cuales se ha demostrado que estos microorganismos sobreviven más tiempo en los quesos blandos que en los duros (26).

Por otra parte, la ausencia de *Brucella* spp. en quesos duros con un contenido de sal de alrededor de 3,47 % (27), puede explicarse por la sensibilidad de *Brucella* spp. a las altas concentraciones de sal (26). Se ha encontrado que la sal utilizada en los procesos de salmuera o salado directo del queso reducen el crecimiento de los microorganismos

Cuadro 1. Porcentaje de muestras positivas para *Salmonella* spp., *Listeria* spp. y *Brucella* spp. por departamento de procedencia del queso

Departamento	Total (+) *Salmonella* spp./ total muestras n (%)	Total (+) *Listeria* spp./ total muestras n (%)	Total (+) *Brucella* spp./ total muestras n (%)
Atlántico	3/6 (50)	4/6 (66,6)	3/6 (50)
Magdalena	10/16 (62,5)	10/16 (62,5)	2/16 (12,5)
Bolívar	2/2 (100)	2/2 (100)	1/2 (50)
Córdoba	1/1 (100)	1/1 (100)	0/1 (0)
Sucre	1/2 (50)	2/2 (100)	0/2 (0)
Total	17/27 (62,9)	19/27 (70,4)	6/27 (22,2)

patógenos y disminuyen su actividad metabólica (28,29). Cinco de las muestras de queso blando analizadas fueron positivas tanto para *Brucella* spp. como para *Listeria* spp., 12 fueron positivas para *Salmonella* y *Listeria* spp., y de estas, ocho eran de queso blando, tres de queso duro y una de queso semiduro.

Se ha reportado la viabilidad de algunas cepas de *Listeria* spp. aisladas de quesos con altas concentraciones de cloruro de sodio (30), lo cual explicaría el mayor porcentaje de muestras positivas de Listeria spp. frente a los otros microorganismos evaluados en este estudio.

Otro factor que se debe tener en cuenta es el crecimiento de microorganismos que hacen parte de la microflora del alimento y que compiten por los nutrientes, hecho que aumenta la probabilidad de reportar falsos negativos atribuibles principalmente al método microbiológico tradicional, el cual determina cualitativamente la presencia o ausencia de microorganismos y, además, emplea medios de cultivo selectivos a lo largo de muchas etapas, como las de caracterización bioquímica y serológica de colonias bacterianas (31).

Aunque el método estándar o cultivo microbiológico tradicional tiene un gran valor en los estudios epidemiológicos, su sensibilidad es baja y la confirmación de los resultados tarda entre cuatro y cinco días (32), por lo tanto, es necesario emplear metodologías más sensibles de diagnóstico, como la qPCR (21). Aunque la técnica de qPCR detecta el ADN de los microorganismos y no determina su viabilidad, se pudo confirmar su aplicabilidad para detectar microorganismos de difícil aislamiento por su elevado límite de detección.

En diversas investigaciones, se han reportado límites de detección para el ADN de *Brucella* spp. del orden de 16 a 1.600 ng con diferentes protocolos de qPCR (33). En este estudio fue posible la detección con 83,25 ng de ADN total extraído de una muestra positiva, lo que evidencia el aumento de la probabilidad de detección en muestras de alimentos en las cuales estos agentes patógenos se encuentran generalmente en pequeñas cantidades. En un estudio de 30 muestras de queso, realizado en México, no se detectaron bacterias mediante el método microbiológico, lo cual se explicó por el bajo número de microorganismos presente en el alimento (34). En un estudio en Brasil, solo mediante PCR convencional fue posible detectar la bacteria en quesos ilegales (35).

El hecho de que en cuatro de las muestras de queso en este estudio no hubo amplificación del control interno, se explicaría, según estudios previos, por la presencia de inhibidores de la PCR. En tales estudios se han reportado variaciones en la inhibición de polimerasas en diferentes concentraciones de la muestra (36,37). Entre los inhibidores de polimerasas presentes en alimentos como el queso, se han reportado el sodio y el calcio.

En este estudio se presentó un mayor porcentaje de inhibición en muestras de queso duro, lo cual se puede asociar a su alto contenido de cloruro de sodio, ya que las polimerasas Ultma, rTth, Taq, HotTub, Tfl y Taq son sensibles a concentraciones mayores de 60 mM de Na^{+2}. También, se ha reportado un efecto inhibitorio de la Taq polimerasa con concentraciones mayores de 0,2 mM de Ca^{+2}, lo que puede explicar la inhibición en algunas muestras de queso blando, pues se ha demostrado que en productos lácteos el calcio es la mayor fuente de inhibición, aunque también el magnesio utilizado en la reacción de PCR puede tener efecto inhibitorio inverso de los iones calcio (38).

En cuanto a la presencia de bacterias como *Salmonella* spp. y *Listeria* spp., que son de difícil aislamiento, su gran frecuencia sugeriría su presencia a lo largo de toda la cadena de producción del queso, desde la obtención de la leche en las fincas hasta la distribución del producto. La presencia de dichas bacterias en estos productos se ha reportado en otros trabajos en Colombia, en los cuales se ha determinado que el queso fresco es uno de los alimentos con mayor presencia de *L. monocytogenes* entre los de venta callejera en Bogotá (39), así como en las ciudades de Montería y Cereté, donde se confirmó que los quesos caseros frecuentemente están contaminados con *Listeria* spp. (40,41). A nivel internacional, se han reportado *Salmonella* spp. y *Listeria* spp. en quesos frescos de venta callejera (42).

El presente estudio fue un ensayo piloto en el que se demostró la utilidad de la técnica de qPCR como método alternativo para determinar el estado microbiológico del queso y para el desarrollo de estudios de vigilancia epidemiológica, al demostrar la presencia de microorganismos de difícil aislamiento, como *Brucella* spp., *Salmonella* spp. y *Listeria* spp., en muestras de queso costeño procedentes de diferentes departamentos de la costa Caribe colombiana.

Estos resultados constituyen una alerta de salud pública en torno al queso como producto que puede transmitir estas bacterias, y plantea la necesidad de implementar planes de vigilancia y control.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Universidad Libre, seccional Barranquilla, por el financiamiento de este trabajo.

Conflicto de intereses

No existe ninguno.

Financiación

Este trabajo fue financiado por la Universidad Libre, seccional Barranquilla, y el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias (Convenio Universidad Libre - Colciencias No. 116 y PS-2011-000392).

Referencias

1. **Pui CF, Wong WC, Chai LC, Tunung R, Jeyaletchumi P, Noor Hidayah MN, *et al.*** *Salmonella*: A foodborne pathogen. Int Food Res J. 2011;18:465-73.
2. **Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe R V, Widdowson M-A, Roy SL, *et al.*** Foodborne illness acquired in the United States–major pathogens. Emerg Infect Dis. 2011;17:7-15. https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101
3. **Garrido A, Chapela MJ, Román B, Fajardo P, Lago J, Vieites JM, *et al.*** A new multiplex real-time PCR developed method for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* detection in food and environmental samples. Food Control. 2013;30:76-85. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.029
4. **Organización Mundial de la Salud.** Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos. Fecha de consulta: 26 de febrero de 2016. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/consumer/manual_keys_es.pdf
5. **Instituto Nacional de Salud.** Protocolo de vigilancia en salud pública. Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Fecha de consulta: 26 de febrero de 2016. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Enfermedades%20Trans.%20por%20alimentos.pdf
6. **Codex Alimentarius.** Codex General Standard for Cheese. Fecha de consulta: 26 de febrero de 2016. Disponible en: www.fao.org/input/download/standards/175/CXS_283e.pdf
7. **Ministerio de Salud de Colombia.** Resolución número 02310 de febrero 24 de 1986. Por la cual se reglamenta parcialmente el Título V de la Ley 09 de 1979, en lo referente a procesamiento, composición, requisitos, transporte y comercialización de los derivados lácteos. Fecha de consulta: 26 de febrero de 2016. Disponible en: https://www.invima.gov.co/images/stories/resoluciones/resolucion_02310_1986.pdf
8. **Departamento Nacional de Planeación.** Estudio para la identificación de los productos potenciales en los sectores agropecuarios, agroindustrial y artesanal, que podrían ser protegidos a través de DENOMINACIONES de origen, marcas colectivas o de certificación. Fecha de consulta: 26 de febrero de 2016. Disponible en: https://colaboracion.dnp.gov.co/CDT/Desarrollo%20Empresarial/propiedad_intelectual.pdf
9. **Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA.** Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. Foodborne Pathog Dis. 2005;2:115-29. https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.115
10. **Anderson AM.** Notes of a peculiar teat-eruption in a milch cow, coincident with an outbreak of typhoid fever amongst the consumers of the milk. Br Med J. 1889;2:465-71.
11. **Fleming DW, Cochi SL, Macdonald KL, Brondum J, Hayes PS, Plikaytis BD, *et al.*** Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N Engl J Med. 1985;312:404-7. https://doi.org/10.1056/NEJM198502143120704
12. **Ebel ED, Williams MS, Tomlinson SM.** Estimating herd prevalence of bovine brucellosis in 46 U.S.A. states using slaughter surveillance. Prev Vet Med. 2008;85:295-316. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.02.005
13. **Claeys WL, Cardoen S, Daube G, De Block J, Dewettinck K, Dierick K, *et al.*** Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. Food Control. 2013;31:251-62. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.035
14. **Dhanashekar R, Akkinepalli S, Nellutla A.** Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. Germs. 2012;2:101-9. https://doi.org/10.11599/germs.2012.1020
15. **Meltzer E, Sidi Y, Smolen G, Banai M, Bardenstein S, Schwartz E.** Sexually transmitted brucellosis in humans. Clin Infect Dis. 2010;51:e12-5. https://doi.org/10.1086/653608
16. **Wyatt HV.** Surgeon Captain Sheldon F Dudley and the person to person spread of brucellosis by inhalation. J R Nav Med Serv. 2010;96:185-7.
17. **Plommet M, Fensterbank R, Vassal L, Auclair J, Mocquot G, Courault M, *et al.*** Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheese made from naturally infected cow's milk. Lait. 1988;68:115-20.
18. **Sambrook J, Russell D.** Molecular cloning: A laboratory manual. Third edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. p. 2100.
19. **Osorio FJ, Patiño A, Linares C, Romero LA, Ortiz J, Reina JF, *et al.*** Colombia, Sanidad Animal 2012. Fecha de consulta: 26 de febrero de 2016. Disponible en: http://www.ica.gov.co/getattachment/bce28fb3-c2c7-4f46-99fc-6bae850353fc/2012.aspx
20. **Vergara D, Torres MF, González F, Lasso N, Ortega C.** Prevalencia de brucelosis en la leche cruda de bovinos expendida en el municipio de Popayán, Cauca, septiembre a diciembre de 2006. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2008;6:76-85.
21. **Mosquera X, Bernal C, Muskus C, Berdugo J.** Detección de *Brucella abortus* por PCR en muestras de sangre y leche de vacunos. Rev MVZ Córdoba. 2008;13:1504-13.
22. **Vásquez E, Máttar S, Mossos N, Mogollón D, Poutou R.** Caracterización molecular de cepas colombianas de *Salmonella* spp. a través del RFLP-IS200. Nova. 2005;3:37-45.

23. **Durango J, Arrieta G, Máttar S.** Presencia de *Salmonella* spp. en un área del Caribe colombiano: un riesgo para la salud pública. Biomédica. 2004;24:89-96. https://doi.org/10.7705/biomedica.v24i1.1252

24. **Muñoz AI.** Distribución de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados de alimentos, Colombia, 2000-2009. Biomédica. 2012;32:408-17. https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.709

25. **Gahan CG, O'Driscoll B, Hill C.** Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. Appl Environ Microbiol. 1996;62:3128-32.

26. **International Commission on Microbiological Specifications for Foods.** Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acribia; 1998. p. 612.

27. **Rodríguez Á, Novoa C.** Guía para producir quesos colombianos. Bogotá: Banco Ganadero-Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos; 1994. p. 139.

28. **Donnelly CW.** Growth and survival of microbial pathogens in cheese. En: Fox P, McSweeney P, Cogan T, Guinee T, editors. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Third edición. London: Elsevier Ltd.; 2004. p. 541-59.

29. **Boons K, van Derlinden E, Mertens L, Peeters V, van Impe JF.** Effect of immobilization and salt concentration on the growth dynamics of *Escherichia coli* K12 and *Salmonella typhimurium*. J Food Sci. 2013;78:567-74. https://doi.org/10.1111/1750-3841.12067

30. **Faleiro ML, Andrew PW, Power D.** Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. Int J Food Microbiol. 2003;84:207-16. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00422-1

31. **Feldsine PT, Lienau AH, Leung SC, Mui LA, Humbert F, Bohnert M, *et al.*** Detection of *Salmonella* in fresh cheese, poultry products, and dried egg products by the ISO 6579 *Salmonella* culture procedure and the AOAC official method: Collaborative study. J AOAC Int. 2003;86:275-95.

32. **Urrutia M, Reyes E, Melo C, Henríquez M, Pineda J, Sakurada A.** Estandarización de una técnica para la detección de *Salmonella* spp. útil para manipuladores de alimentos mediante técnica de amplificación molecular. Cienc Trab. 2006;8:164-6.

33. **Al Dahouk S, Nöckler K, Scholz HC, Pfeffer M, Neubauer H, Tomaso H.** Evaluation of genus-specific and species-specific real-time PCR assays for the identification of *Brucella* spp. Clin Chem Lab Med. 2007;45:1464-70. https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.305

34. **Villanueva M.** Frecuencia de *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 en quesos frescos sin pasteurizar colectados en la zona conurbana-Veracruz, Boca del Río (tesis). Veracruz: Universidad Veracruzana; 2010.

35. **Miyashiro S, Scarcelli E, Piatti RM, Campos FR, Vialta A, Keid LB, *et al.*** Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR). Brazilian J Microbiol. 2007;38:17-22. https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000100005

36. **Abu Al-Soud W, Rådström P.** Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. Appl Environ Microbiol. 1998;64:3748-53.

37. **Rossen L, Nørskov P, Holmstrøm K, Rasmussen OF.** Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. Int J Food Microbiol. 1992;17:37-45. https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90017-W

38. **Bickley J, Short JK, McDowell DG, Parkes HC.** Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. Lett Appl Microbiol. 1996;22:153-8. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb01131.x

39. **Muñoz AI, Vargas M, Otero L, Díaz G, Guzmán V.** Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C., 2002-2008. Biomédica. 2011;31:428-39. https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i3.394

40. **Gallegos J, Arrieta G, Máttar S, Poutou R, Trespalacios A, Carrascal A.** Frecuencia de *Listeria* spp. en quesos colombianos costeños. Rev MVZ Córdoba. 2007;12:996-1012.

41. **Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Nacional de Salud.** Identificación de riesgos biológicos asociados al consumo de leche cruda bovina en Colombia. Fecha de consulta: 26 de febrero de 2016. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-peligros-biologicos-en-leche.pdf

42. **Alcázar C, Rubio M, Núñez F, Alonso R.** Detección de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se expenden en vía pública en la ciudad de México. Vet México. 2006;37:417-29.

Biomédica 2018;38:37-50
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3871

ARTÍCULO ORIGINAL

Variabilidad genética en regiones codificantes del antígeno de superficie y el dominio de la transcriptasa inversa de la polimerasa del virus de la hepatitis B, Colombia, 2002-2014

Dioselina Peláez-Carvajal[1], Nidia Janeth Forero[1,2], Martha Escalante-Mora[1], Katherine Laiton-Donato[1], José Aldemar Usme-Ciro[1,3]

[1] Laboratorio de Virología, Subdirección de Laboratorio Nacional de Referencia, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Grupo de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia
[3] Centro de Investigación en Salud para el Trópico, Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia, Santa Marta, Colombia

Introducción. Se estima que 240 millones de personas en el mundo tienen infección crónica con el virus de la hepatitis B (HBV). En Colombia, la endemia es variable y circulan diferentes genotipos virales. Las mutaciones a lo largo del genoma se han asociado con resistencia antiviral, el escape ante la reacción de anticuerpos neutralizadores tras la vacunación o a la infección natural, la infección oculta y la progresión a carcinoma hepatocelular.
Objetivo. Identificar los genotipos y las mutaciones presentes en la región codificante del antígeno de superficie (S) y del dominio de la transcriptasa inversa (*reverse transcriptase*, RT) de la polimerasa del HBV en muestras de suero remitidas al Instituto Nacional de Salud de Colombia para el diagnóstico de hepatitis B, entre el 2002 y el 2014.
Materiales y métodos. En 495 muestras de suero positivas para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) se buscó el ADN viral, se amplificó y secuenció un fragmento de 1.591 nucleótidos y, posteriormente, se hizo el análisis filogenético correspondiente.
Resultados. En 66 de las muestras se logró detectar el genoma viral y 28 de ellas se secuenciaron exitosamente. El análisis filogenético permitió identificar los genotipos y subgenotipos F3 y A2. Una muestra presentó simultáneamente las sustituciones de resistencia L180M y M204V, otra presentó la sustitución I169L y en una se identificó la mutación P120Q, previamente asociada con variantes de escape. Dos muestras presentaron una deleción de 105 nucleótidos en la región preS1-preS2.
Conclusiones. Se corroboró la circulación en Colombia de los genotipos y subgenotipos F3 y A2, así como la presencia de mutaciones de resistencia y escape. El presente estudio constituye un aporte a la epidemiologia molecular del HBV en Colombia.

Palabras clave: virus de la hepatitis B; genotipo; ADN polimerasa dirigida por ARN; mutación.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3871

Genetic variability in coding regions of the surface antigen and reverse transcriptase domain of hepatitis B virus polymerase, Colombia, 2002-2014

Introduction: Despite the availability of an effective vaccine and treatment to reduce the viral load and progressive hepatocellular injury, approximately 240 million people worldwide are chronically infected with the hepatitis B virus (HBV). In Colombia, the circulation of different viral genotypes has been confirmed. Mutations in the genome have been associated to antiviral therapy resistance, viral escape to neutralizing antibodies, occult infection and progression to hepatocellular carcinoma.
Objective: To identify the genotypes and the presence of mutations in the coding region of the surface (S) antigen and the reverse transcriptase (RT) domain of the polymerase of HBV obtained from serum samples for hepatitis B diagnosis received by the *Instituto Nacional de Salud* during the period 2002-2014.
Materials and methods: A total of 495 serum samples with previous HBsAg reactive result were used for molecular detection. A fragment of 1,591 nucleotides was sequenced, and the corresponding phylogenetic analysis was performed.

Contribución de los autores:
Dioselina Peláez-Carvajal: diseño del estudio y redacción del manuscrito
Nidia Janeth Forero: detección y análisis molecular
Martha Escalante-Mora: ensayos serológicos
José Aldemar Usme-Ciro: análisis molecular y redacción del manuscrito
Katherine Laiton-Donato: secuenciación y edición de secuencias
Todos los autores participaron en la interpretación y la discusión de los resultados.

Results: We detected the viral genome of HBV in 66 samples and 28 were successfully sequenced. The phylogenetic analysis allowed the identification of subgenotypes F3 and A2. The L180M and M204V resistance mutations were simultaneously identified in one sample, while the I169L resistance mutation was identified in another one. A single escape mutation, P120Q, was identified in one more. Two samples showed a deletion of 105 nucleotides in the preS1-preS2 region.
Conclusions: The circulation of genotypes/subgenotypes F3 and A2 of HBV in Colombia was corroborated, as well as the presence of some resistance and escape mutations. The present study constitutes a contribution to the molecular epidemiology of HBV in Colombia.

Key words: Hepatitis B virus; genotype; RNA-directed DNA polymerase; mutation.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3871

La hepatitis B constituye una de las hepatitis virales más importantes en salud pública por estar relacionada en su fase crónica con el desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular (1). La proporción de individuos adultos cuya infección aguda por HBV progresa a la fase crónica es de 5 a 10 %, en tanto que en niños menores de cinco años la proporción es de 25 a 30% y, en recién nacidos, hasta de 90 % (2).

A nivel mundial, se estima que, aproximadamente, 240 millones de personas presentan infección crónica y más de 686.000 mueren cada año como consecuencia de la enfermedad y sus complicaciones (3). La seroprevalencia de hepatitis B en Latinoamérica es de 0,48 %, aproximadamente, y en Colombia se estima en 2,29 % (4). En el 2016, se notificaron 1.967 casos de hepatitis B al sistema nacional de vigilancia epidemiológica (Sivigila), 42 % de los cuales provenía de Antioquia, Bogotá y Norte de Santander; la incidencia nacional de hepatitis B fue de cuatro casos por cada 100.000 habitantes (5). Con un patrón epidemiológico heterogéneo debido a las diferencias geográficas, étnicas, culturales y socioeconómicas, se considera que el país tiene una endemia de baja a intermedia (6), aunque en algunos departamentos, entre ellos Amazonas, Chocó, Guaviare, Magdalena y Norte de Santander, es alta (7-9).

El virus de la hepatitis B (HBV) pertenece a la familia Hepadnaviridae, género *Orthohepadnavirus*, su genoma es una molécula de ADN circular, parcialmente de doble hebra y de 3,2 kb, aproximadamente, constituido por marcos de lectura parcialmente superpuestos que codifican para las proteínas preCore/Core, preS1/preS2/S, polimerasa y X (10). El análisis filogenético de las cepas del HBV circulantes a nivel mundial ha permitido la identificación de 10 genotipos (A-J) con una divergencia en la secuencia genómica mayor de 8 %, y la asignación de más de 30 subgenotipos definidos como aquellos linajes conformados por cepas con una divergencia de nucleótidos de 4 a 8 % (11,12). En Colombia, se ha reportado la circulación de los genotipos y subgenotipos A1, A2, C, D3, E, F1a, F1b, F3 y G (6,8,13-19), siendo el genotipo F el de mayor prevalencia en Suramérica (12).

Aunque la progresión y la gravedad de la hepatitis B responden a múltiples factores, los estudios epidemiológicos han permitido establecer asociaciones entre los diferentes genotipos y variables tales como las vías de transmisión, la progresión a la fase crónica de la enfermedad, el tiempo de progresión y la gravedad de la enfermedad (20).

Por otro lado, diversos estudios han permitido la identificación de mutaciones puntuales en el dominio de la transcriptasa inversa (*reverse transcriptase*, RT) del HBV que confieren resistencia a los principales medicamentos antivirales disponibles: lamivudina (3TC), entecavir (ETV), telbivudina (LdT), adefovir (ADV) y tenofovir (TDF) (21). Asimismo, se han identificado mutaciones puntuales y deleciones en las regiones S, preS1 y preS2 del gen de la envoltura del HBV, las cuales se han asociado con la presentación clínica de la enfermedad (22), con la neutralización a cargo de anticuerpos generados tras la vacunación o como resultado de una infección natural (23), o de casos de infección oculta por HBV (24), así como con la sensibilidad de los inmunoensayos utilizados para el diagnóstico serológico (25).

En el presente estudio, se llevó a cabo la detección molecular, la genotipificación y la identificación de mutaciones en las regiones codificantes del antígeno S y el dominio RT de la polimerasa del HBV a partir de 495 muestras de suero con

Correspondencia:
Dioselina Peláez-Carvajal, Laboratorio de Virología, Subdirección de Laboratorio Nacional de Referencia, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Telefax:(571) 220 0770, extensión: 1428
dpelaez@ins.gov.co

Recibido: 07/04/17; aceptado: 07/12/17

resultado positivo para HBsAg provenientes de los 32 departamentos de Colombia, las cuales se recibieron para diagnostico de hepatitis B en el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud, durante el periodo 2002-2014.

Materiales y métodos

Muestras clínicas

Se hizo un estudio descriptivo, longitudinal y retrospectivo, de 495 muestras de sueros provenientes de 32 departamentos del país y de Bogotá, conservadas en congelación entre los -20 °C y los -30 °C en la seroteca del Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud para el diagnóstico de hepatitis B, y recolectadas durante el periodo 2002-2014 (figura 1a). Se seleccionaron muestras con resultado positivo en la prueba ELISA para el antígeno de superficie de HBV (HBsAg), no necesariamente confirmado mediante prueba de neutralización.

Extracción del ADN viral y amplificación de las regiones codificantes del antígeno S y del dominio RT de la polimerasa del HBV mediante PCR

Para la extracción del ADN viral, y ante la eventual necesidad de detectar virus con genoma de ARN (virus de hepatitis A, C, delta y E), se utilizó el estuche PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la amplificación y secuenciación de las regiones codificantes del antígeno S y del dominio RT de la polimerasa del HBV, se utilizaron los oligonucleótidos externos HBPr1_Sense 5'-gggt caccatattcttggg-3' y HBPr374_Antisense 5'-gttcc gcagtatggatcggcagagg-3', previamente descritos por Stuyver, *et al.* (26), los cuales se extienden desde la posición 2816-3182...1-1281 del genoma de referencia, número de acceso en GenBank: NC_003977.2.

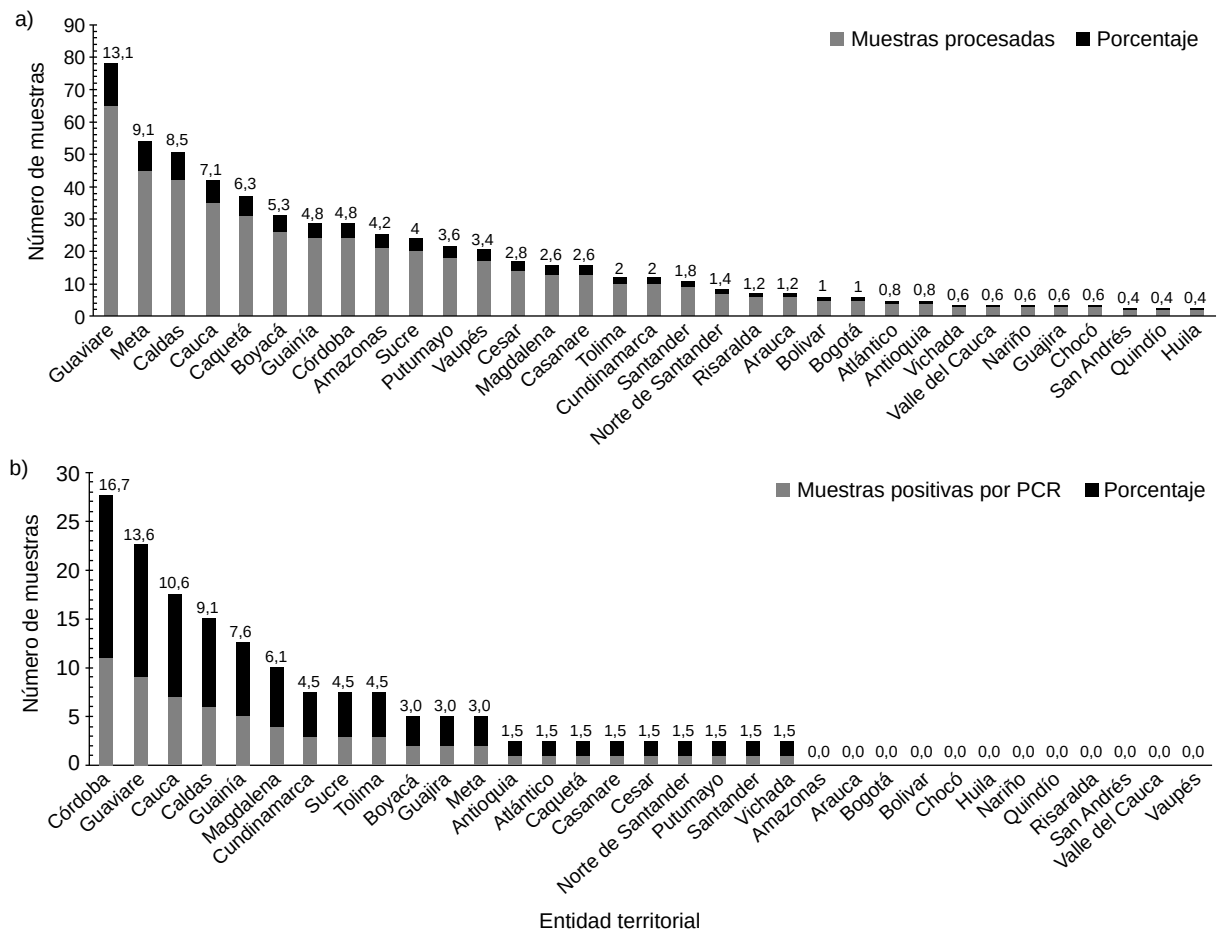

Figura 1. Muestras procesadas mediante PCR y positivas para HBV, según departamento, 2002-2014. a) Distribución de muestras analizadas según ente territorial. b) Distribución de muestras positivas en la PCR para los genes P (parcial) y S del HBV

La mezcla de reacción para la PCR incluyó 10 pmoles de cada oligonucleótido, 1,35 U de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 60 mM de Tris-SO_4 (pH 8,9), 18 mM de $(NH4)_2SO_4$, 2,4 mM de $MgSO_4$, 480 nM de cada dNTP, 5 µl del extracto de ADN viral y agua libre de nucleasas, para un volumen final de 25 µl.

El perfil térmico consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante dos minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación (a 94 °C durante 30 segundos, a 50 °C durante 30 segundos, a 72 °C durante dos minutos) y una extensión final a 72 °C durante cinco minutos.

Los amplicones esperados, de 1.648 pb, aproximadamente, se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1X, se tiñeron con SYBR Safe DNA Gel Stain™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) y se visualizaron mediante el fotodocumentador GelDoc XR™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Secuenciación, edición de secuencias y análisis filogenético

Los productos de PCR positivos para ADN del HBV se purificaron utilizando el estuche QIAquick PCR Purification Kit™ (QIAGEN Inc, Valencia, CA, USA) y se secuenciaron usando el estuche BigDye Terminator, versión 3.1, Cycle Sequencing Kit™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), según las instrucciones del fabricante.

La secuenciación se llevó a cabo en un Genetic Analyzer ABI 3130™ (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Las secuencias obtenidas se visualizaron, editaron y ensamblaron mediante el módulo SeqMan de la suite Lasergene, versión 7.2.1™ (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) y, posteriormente, se alinearon empleando el algoritmo ClustalW con el programa MEGA 6.0 (27). Se incluyeron secuencias disponibles en el GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) pertenecientes a los diferentes genotipos y subtipos del HBV humano, así como el máximo número de secuencias colombianas previamente reportadas y con la longitud genómica requerida para estos análisis y, además, una secuencia de HBV derivada del mono lanudo como grupo externo (número de acceso en GenBank: AY226578).

Para la reconstrucción del árbol filogenético, se generaron dos matrices: la primera, para analizar la longitud máxima del genoma, se extendía entre las posiciones 2858-3182...1-1266 (1.591 pb). y la segunda, para incluir el máximo número de secuencias colombianas previamente reportadas, se extendía entre las posiciones 281 y 657 (377 pb) del genoma circular de referencia NC_003977.2. Para cada matriz se seleccionó el modelo evolutivo que mejor se ajustara a los datos, utilizando el programa jModelTest (28).

El análisis filogenético se hizo con el programa MEGA 6.0 y el método de *neighbor-joining*. El soporte de la topología del árbol se obtuvo mediante un proceso de *bootstrap* de 1.000 réplicas.

Análisis de mutaciones de resistencia a medicamentos antivirales y de escape

Para la determinación del impacto de las diferentes mutaciones presentes en las secuencias del HBV circulantes en el país, se emplearon dos herramientas bioinformáticas disponibles en línea: la *HIV-grade HBV drug resistance interpretation* (DRI) (29) y la *Geno2pheno* [HBV] (G2P) (30), las cuales permiten determinar el genotipo viral, identificar las mutaciones en la región codificante del dominio RT de la polimerasa viral asociadas con resistencia a fármacos e identificar mutaciones en el marco de lectura abierto (*Open Reading Frame,* ORF) del gen que codifica para el antígeno S pequeño (S-HBsAg), previamente asociadas con escape por disminución de la unión al anticuerpo.

La DRI y la G2P se encuentran disponibles en los enlaces: http://www.hiv-grade.de/hbv_grade/deployed/grade.pl?program=hbvalg y http://hbv.geno2pheno.org/, respectivamente.

Resultados

Distribución de las muestras por departamento

En el estudio se incluyeron 495 muestras de sueros con resultado positivo para HBsAg, lo cual permitió tener una representación de las diferentes regiones de Colombia (figura 1a), con un mínimo de dos y un máximo de 65 sueros provenientes de cada una de las 33 entidades territoriales, incluida Bogotá. Sin embargo, la incidencia del HBV reportada por año epidemiológico por las distintas entidades territoriales, es diferente al número de muestras recibidas en el Instituto Nacional de Salud, ya que la remisión de muestras depende de la capacidad de diagnóstico de cada departamento y del nivel de referencia que registran frente al Instituto.

Caracterización molecular de genotipos y subgenotipos circulantes del HBV en Colombia

Mediante amplificación por PCR convencional de 66 muestras (13,3 % del total de las muestras

procesadas) provenientes de 21 unidades territoriales del país, se obtuvo un fragmento de banda única y del tamaño esperado correspondiente al ORF S y, región codificante del dominio RT de la polimerasa del HBV. Los departamentos de Córdoba, Guaviare, Cauca, Caldas, Guainía y Magdalena, presentaron la mayor positividad, contribuyendo en conjunto con el 63,6 % de las muestras positivas mediante detección molecular (figura 1b).

Del total de muestras amplificadas por PCR, 28 (42,4 %) se secuenciaron y, mediante el análisis filogenético, se identificaron los genotipos A y F, cuyos subgenotipos fueron el A2 y el F3, respectivamente (figura 2). De las 28 secuencias, 24 (85,7 %) correspondieron al genotipo F y 4 (14,3 %) al genotipo A, similar a lo reportado para el país en estudios previos (7,13,19). El análisis filogenético mediante la matriz 1 con secuencias de longitud de 1.591 pb, permitió la identificación confiable de los subgenotipos.

Todas las secuencias de HBV de genotipo F identificadas en el presente estudio, pertenecían al subgenotipo F3 con una gran confiabilidad (soporte en el proceso de *bootstrap* de 92 %). De igual forma, todas las secuencias del HBV, genotipo A, identificadas pertenecían al subgenotipo A2, con una gran confiabilidad (soporte en el proceso de *bootstrap* de 99 %), similar a lo previamente reportado (16).

Con base en la región genómica representada por la matriz 1, cuyos sitios variables se muestran en la figura 3, se estimó la divergencia evolutiva promedio del HBV entre cada par de cepas colombianas de los subgenotipos A2 (0,003 sustituciones por sitio) y F3 (0,007 sustituciones por sitio) y entre dichos subgenotipos (0,162 sustituciones por sitio entre cada par de cepas colombianas). No se identificaron secuencias pertenecientes a los genotipos C, D, E y G, que previamente habían sido reportados en el país (16).

Teniendo en cuenta que las secuencias disponibles pertenecientes a dichos genotipos no fueron lo suficientemente extensas o no correspondían completamente a la región secuenciada en el presente estudio (matriz 1), se generó una segunda matriz (matriz 2), con el fin de establecer las relaciones filogenéticas y obtener un panorama completo de los genotipos que han circulado en el país (figura 4). En este árbol filogenético se pueden observar los diferentes genotipos representados; sin embargo, en general, no fue posible establecer subgenotipos debido a los bajos soportes en el *bootstrap,* resultantes del análisis de un fragmento corto con una menor cantidad de sitios informativos a nivel filogenético.

La secuencia de la muestra identificada con el código 49791_Cauca_CO_2003, presentó un gran número de sitios variables, los cuales se designaron según el código internacional de ambigüedad de nucleótidos (figura 3). La gran frecuencia de sustituciones no sinónimas en dicha secuencia (figura 5), sugiere la presencia de una infección simultánea con dos diferentes cepas del HBV; sin embargo, sería necesaria la clonación y secuenciación de los clones del producto de la PCR para confirmar o refutar dicha hipótesis.

Mutaciones en el ORF S y la región codificante del dominio RT de la polimerasa del HBV circulante en Colombia y su asociación con resistencia a medicamentos antivirales y con el escape

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas, se identificaron mutaciones asociadas con resistencia a medicamentos antivirales en dos de las muestras secuenciadas. La secuencia de la cepa 49884_Cundinamarca_CO_2003, perteneciente al genotipo A, presentó simultáneamente dos sustituciones (L180M y M204V) previamente asociadas con resistencia a LdT, 3TC y ETV (31,32), e identificadas recientemente en un paciente colombiano con hepatopatía en estado terminal (33) (figura 5). La secuencia de la cepa 60265_Cesar_CO_2004, perteneciente al genotipo F, presentó la sustitución I169L asociada con resistencia a ETV. De todas maneras, en los artículos pertinentes se señala la necesidad de acopiar mayor evidencia clínica sobre dicha asociación (34).

En cuanto a la identificación de mutaciones en el S-HBsAg, únicamente la secuencia de la cepa 48877_Guaviare_CO_2002, perteneciente al genotipo F, presentó la mutación de escape P120Q (figura 6). Las tres mutaciones asociadas con la resistencia a los medicamentos antivirales, se identificaron en muestras provenientes de hombres con edades entre los 17 (dos mutaciones) y los 51 años, en tanto que la mutación de escape se identificó en una mujer de 22 años, cuyo antecedente de vacunación no se pudo determinar (cuadro1).

Dos de las secuencias del HBV obtenidas en el presente estudio, presentaron una deleción en la región preS1-preS2 (figura 7) y, aunque dicha deleción no involucró el antígeno S pequeño

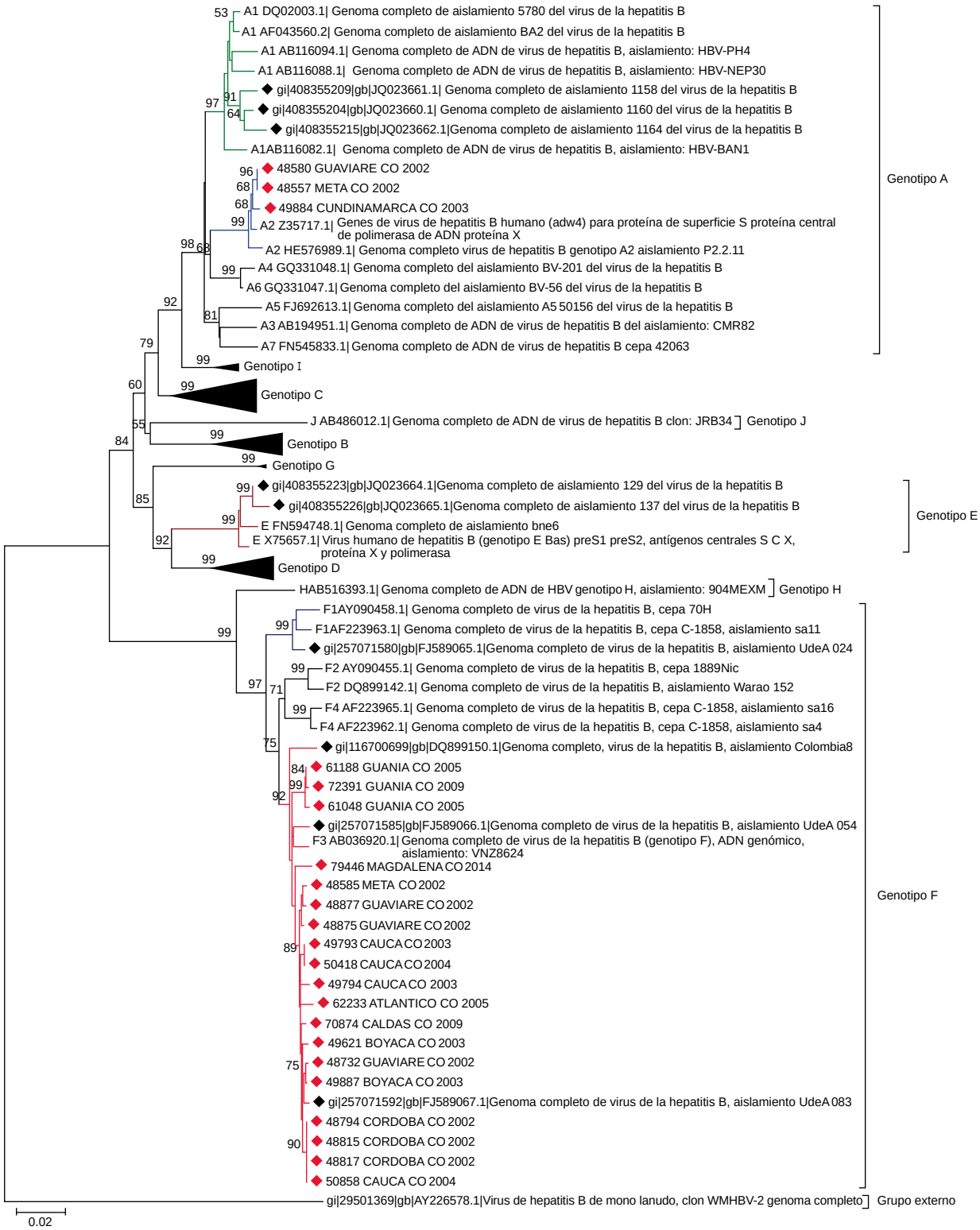

Figura 2. Inferencia filogenética por *neighbor-joining* (NJ) del HBV, basada en el gen de la polimerasa viral (parcial de 1.591 pb). Se utilizó el método de NJ con 1.000 réplicas en el proceso de *bootstrap* y el modelo de sustitución de nucleótidos K2P+G (Shape: 0,77). La secuencia del virus de la hepatitis B del mono lanudo (número de acceso en GenBank: AY226578) se utilizó como grupo externo solo con fines de visualización. Los rombos rojos representan las cepas colombianas secuenciadas en el presente estudio y, los negros, las cepas colombianas previamente depositadas en GenBank.

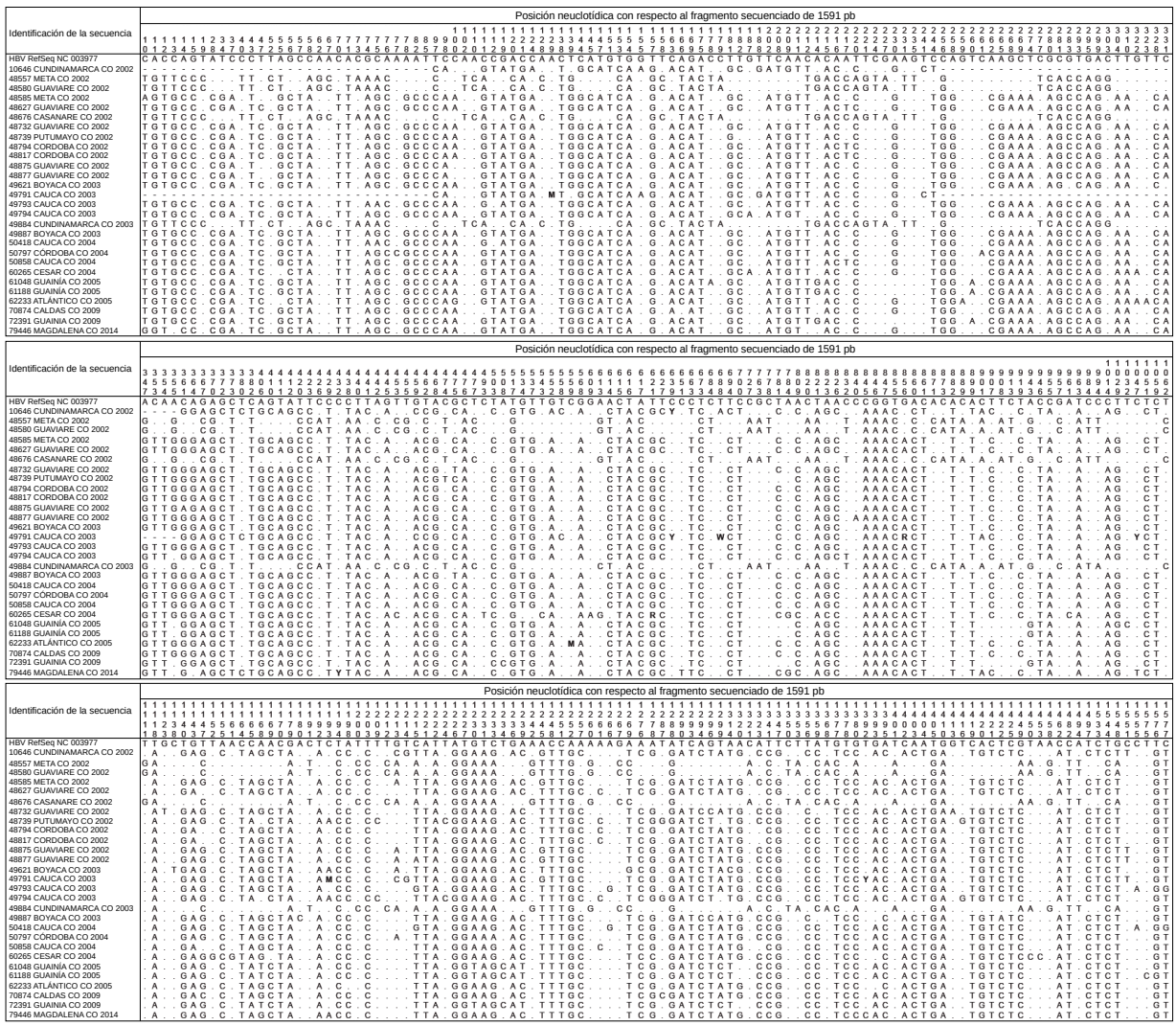

Figura 3. Variabilidad genética en la región secuenciada correspondiente al gen de la polimerasa (parcial) del HBV. Se alinearon las secuencias de 1.591 pb del HBV en muestras del periodo 2002-2014 obtenidas en el presente estudio, frente a la secuencia de referencia NC_003977. La región secuenciada se extiende entre los nucleótidos 2858-3182 y 1-1266 del genoma circular de referencia. Los sitios resaltados en negro corresponden a posiciones con variabilidad genética en el individuo.
M: C/A; R: A/G; Y: C/T; W: A/T

(S-HBsAg), sí comprometía 15 codones de la región codificante del antígeno S mediano (M-HBsAg), incluido el codón de inicio, así como 35 codones codificantes del antígeno S grande (L-HBsAg).

Discusión

El país presenta un patrón heterogéneo en la incidencia y prevalencia de hepatitis B. En el 2016 los departamentos de Guaviare, Amazonas y Vaupés registraron la mayor incidencia de casos (12-20/100.000 habitantes) en tanto que Boyacá, Cauca, San Andrés y Buenaventura notificaron la incidencia mas baja (1-3/100.000 habitantes) (5). Históricamente, también se ha estimado un elevado subregistro, cercano al 80 %, debido al bajo porcentaje de notificación en ciertas unidades territoriales (35,36), lo cual permite inferir cifras mayores de las reportadas oficialmente.

Por tratarse de una enfermedad que en una elevada proporción de los individuos infectados se desarrolla de forma crónica y silenciosa, y sin una fase aguda de mayor consideración, la carga real de la enfermedad y la magnitud de este problema de salud pública solo llegan a ser evidentes a medida que progresa el daño hepático y se manifiesta como cirrosis o carcinoma hepatocelular, condiciones potencialmente mortales que requieren trasplante hepático y dan una reducida esperanza

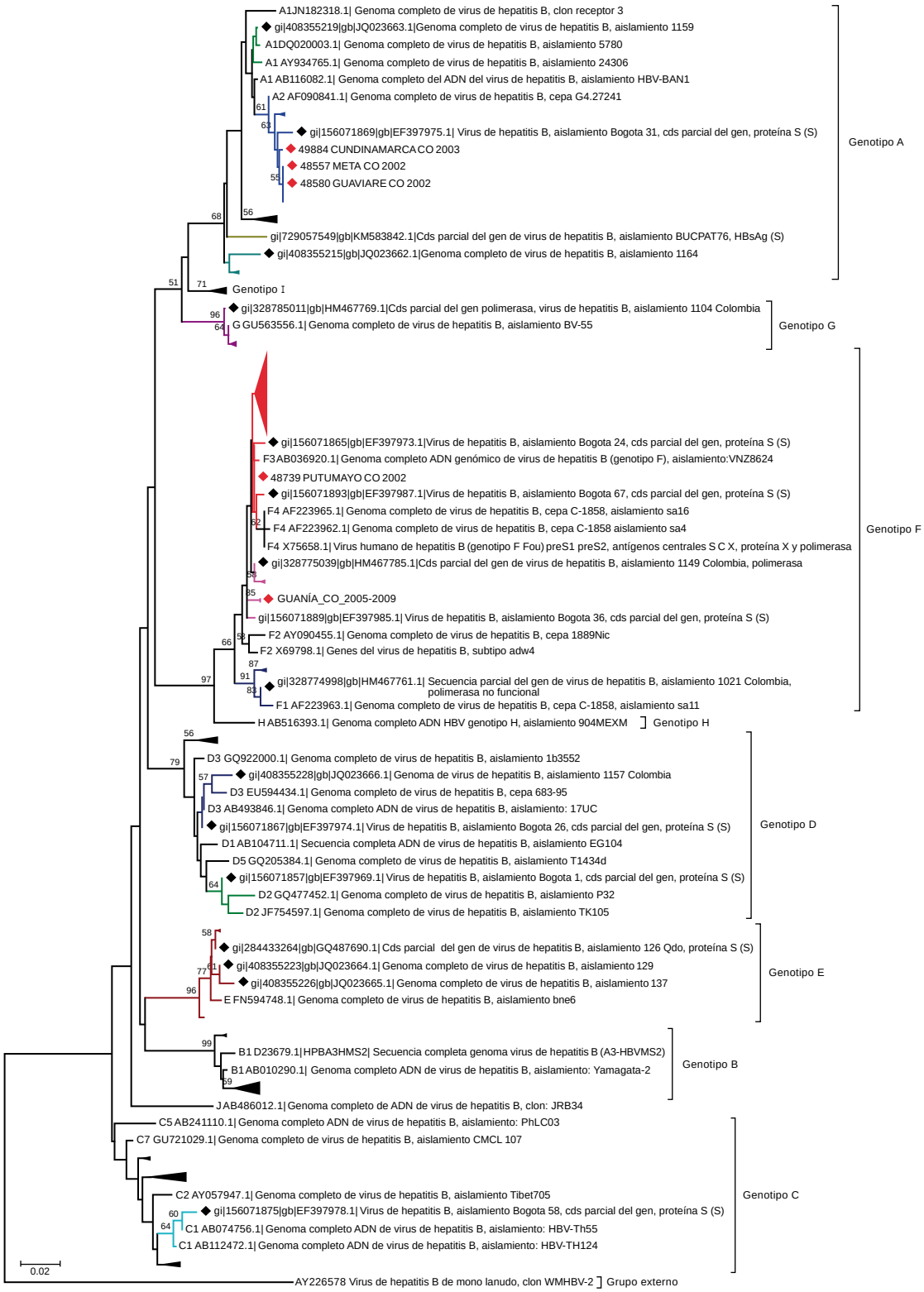

Figura 4. Genotipos del HBV presentes en Colombia. Inferencia filogenética por *neighbor-joining* basada en un fragmento de 377 pb (posiciones 1.155-1.531 del genoma de referencia NC_003977). Se utilizaron 1.000 réplicas de *bootstrap* y el modelo de sustitución de nucleótidos K2P+G (Shape: 0,23). La secuencia del HBV del mono lanudo (número de acceso en GenBank: AY226578) se utilizó como grupo externo con fines de visualización. Los rombos rojos representan las cepas colombianas secuenciadas en el presente estudio y, los negros, las cepas colombianas previamente depositadas en GenBank.

Identificación de la secuencia	Posición de aminoácidos con respecto al dominio RT de la polimerasa de HBV
HBV RefSeq NC 003977	E A H I S H A N Y S L V S R N L N N H P D D Y N L Y Q F R I I L M V S L S F A L P N S N V C Y S E I Q I E I A Q S T C K L
10646 CUNDINAMARCA CO 2002	D H . T A . T T T T . . P . T H D H . Q N . S . . F K L . . . . . L . . . Y . V T A T H R S W T . V H . D V T T A V . . M
48557 META CO 2002	. D . . A . . V T . I I . . . N . . Y Q N . S Q M . K Y W V . . . . . R A Y . . . . . I S W T D V . . H V . . A . S . .
48580 GUAVIARE CO 2002	. D . . A . . V T . I I . . . N . . Y Q N . S Q M . K Y W V . . . . . R A Y . . . . . I S W T D V . . H V . . A . S . .
48585 META CO 2002	. H . T A . T T T . . . P . T H D H . Q N N S . . F . L . . . . . L . . . Y . V T A T H I S W T . V H . D V T T A V . . M
48627 GUAVIARE CO 2002	. H . T A . T T T . . . P . T H D H . Q N N S . . F . L . . . . . L . . . Y . . T A T H . S W T D V H L D V T T A V . . M
48676 CASANARE CO 2002	. D . . A . . V T . I I . . . N . . Y Q N . S Q M . K Y W V . . . . . R A Y . . . . . I S W T D V . . H V . . A . S . .
48732 GUAVIARE CO 2002	. Y . T A . T T T . . . P . T H D H . Q N N S . . F . L . . . . . L . . . Y S V T A T H . S W T D V H . D V T T A V . . M
48739 PUTUMAYO CO 2002	. H . T A . T T T . . . . . T H D H . Q N N S . . F . L . . . . . L . . . Y . V T T N H . S W T D V H L D V T T A V . . M
48794 CÓRDOBA CO 2002	. H . T A . T T T . . . P . T H D H . Q N N S . . F . L . . . . . L . . . Y . . T A T H . S W T D V H L D V T T A V . . M
48817 CÓRDOBA CO 2002	. H . T A . T T T . . . P . T H D H . Q N N S . . F . L . . . . . L . . . Y . . T A T H . S W T D V H L D V T T A V . . M
48875 GUAVIARE CO 2002	. H . T A . T T T . . . P . T H D H . Q N N S . . F . L . . . . . L . . . Y . V T A T H I S W T . V H . D V T T A V . . M
48877 GUAVIARE CO 2002	. H . T A . T T T . . . P . T H D H . Q N N S . . F . L . . . . . L . . . Y . V T A T H I S W T . V H . D V T T A V . . M
49621 BOYACÁ CO 2003	. H . T A . T T T . . . P . T H D H . Q N N S . . F . L . . . . . L . . . Y . V T A N H I S W T D V H . . V T T A V . . M
49791 CAUCA CO 2003	D H . T A . T T T **S/T** . . P . T H D H . Q N **D/N** S . . F K L . . . . . L . . . Y . V T A **T/N** H R S W T . V H . D V T T A V . . M
49793 CAUCA CO 2003	. H . T A . T T T . . . P . T H D H . Q N N S . . F . L . . . . . L . . . Y . V T A T H . S W T D V H . D V T T A V . . M
49794 CAUCA CO 2003	. H . T A . T T T . . . P . T H D H Y Q N N S . . F . L . . . . . L . . . Y . V T T N H . S W T D V H L D V T T A V . . M
49884 CUNDINAMARCA CO 2003	. D . T A . . L T . I I . . . N . . Y Q N . S Q M . K Y W V . M V . . R . Y . . . . . I S W T D V . . H V . . A . S . .
49887 BOYACÁ CO 2003	. Y . T A . T T T . . . P . T H D H . Q N N S . . F . L . . . . . L . . . Y . V T A T H . S W T D V H . D V . T A V . . M
50418 CAUCA CO 2004	. H . T A . T T T . . . P . T H D H . Q N N S . . F . L . . . . . L . . . Y . V T A T H . S W T D V H . D V T T A V . . M
50797 CÓRDOBA CO 2004	. H . T A . T T T . . . P . T H D H . Q N N S . . F . L . . . . . L **S/F** . . Y . V T A T H I S W T D V H . D V T T A V . . M
50858 CAUCA CO 2004	. H . T A . T T T . . . P . T H D H . Q N N S . . F . L . . . . . L . . . Y . . T A T H . S W T D V H L D V T T A V . . M
60265 CESAR CO 2004	. H Y T A . T D T . . . P G T H H H . Q N N S . . F . L . L . . . . . L . . . Y . V T D T H . S W T D V H . D V . T A V R Q M
61048 GUAINÍA CO 2005	. H . T A . T T T . . . . . T H D H . Q N N S . . F . . . V . . . . . L . . . Y . V T S T H . S W T D V H . D V T T A V . . M
61188 GUAINÍA CO 2005	. H . T A . T T T . . . . . T H D H . Q N N S . . F . . . V . . . . . L . . . Y . V T S T H . S W T D V H . D V T T A V . . M
62233 ATLÁNTICO CO 2005	. H . T A **H/N** T T T . . . P . T H D H . Q N N S . . F . L . . . . . L . . . Y . V T A T . . S W T D V H . D V . T A V . . M
70874 CALDAS CO 2009	. H . T A . T T T . . . P . T H D H . Q N N S . . F . L . . . . . L . . . Y . . T A T H . S W T D V H . D V T T A V . . M
72391 GUAINÍA CO 2009	. H . T A . T T T . . . . . T H D H . Q N N S . . F . . . V . . . . . L . . . Y . V T S T H . S W T D V H . D V T T A V . . M
79446 MAGDALENA CO 2014	. H . T A . T T T . . . P G T H D H . Q N N S . . F K L . . . . . L . . . Y . V T A N H . S W T D V H . D V T T A V . . M

Figura 5. Variación de nucleótidos y presencia de mutaciones de resistencia en el dominio RT del gen que codifica para la transcriptasa inversa del HBV. Alineamiento de secuencias del HBV presente en Colombia en el periodo 2002-2014 con respecto a la secuencia de referencia NC_003977. Los sitios resaltados en negro corresponden a posiciones con variabilidad en el individuo. Los sitios resaltados en amarillo corresponden a mutaciones de resistencia a medicamentos antivirales. En el alineamiento solo se presentan los sitios variables.

Identificación de la secuencia	Posición de aminoácidos con respecto al antígeno S pequeño (*Small-HBsAg*)
HBV RefSeq NC 003977	F G F L R L G T T V L S T S T C I S P R M T T Y T S F G K F A P F V T S V I M S Y S L S L F C V Y
10646 CUNDINAMARCA CO 2002	L V C . K P . L P G P **S/L** . L . * L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C N . . I C Y . S
48557 META CO 2002	. . . . . S P . . . . . I . . T . K T P N F . T . A . Y V . . . . . A . . . . . V R I . . . .
48580 GUAVIARE CO 2002	. . . . . S P . . . . . I . . T . K T P N F . T . A . Y V . . . . . A . . . . . V R I . . . .
48585 META CO 2002	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
48627 GUAVIARE CO 2002	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
48676 CASANARE CO 2002	. . . . . S P . . . . . I . . T . K T P N F . T . A . Y V . . . . . A . . . . . V R I . . . .
48732 GUAVIARE CO 2002	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
48739 PUTUMAYO CO 2002	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
48794 CÓRDOBA CO 2002	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
48817 CÓRDOBA CO 2002	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
48875 GUAVIARE CO 2002	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
48877 GUAVIARE CO 2002	L V C . K . . L P G P . . L . . L T **Q** K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
49621 BOYACÁ CO 2003	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
49791 CAUCA CO 2003	L V C . K P . L P G P **S/L** . L . **C/*** L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . **T/I** L . . I N C **S/N** . . . I C Y . S
49793 CAUCA CO 2003	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
49794 CAUCA CO 2003	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
49884 CUNDINAMARCA CO 2003	L . . . . . S P . . . . . I . . T . K T P N F . T . A . Y V . . . . . A M . . . . V . I . . . .
49887 BOYACÁ CO 2003	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
50418 CAUCA CO 2004	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
50797 CORDOBA CO 2004	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
50858 CAUCA CO 2004	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
60265 CESAR CO 2004	L . . S K . E I P **G/E** P . . L . . L T . K T L . F S . L . N Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y G S
61048 GUAINÍA CO 2005	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C A . L . . I N C . . . I C Y . S
61188 GUAINIA CO 2005	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
62233 ATLÁNTICO CO 2005	L V C . K L . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
70874 CALDAS CO 2009	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
72391 GUAINÍA CO 2009	L V C . K . . L P G P . . L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . . L . . I N C . . . I C Y . S
79446 MAGDALENA CO 2014	L V C . K . . L P G P . . I L . . L T . K T L . F S . L . . Y . Q C . I L . . I N C . . . I C Y . S

Figura 6. Variación de aminoácidos y presencia de mutaciones de escape en el antígeno S pequeño del HBV (S-HBsAg). Alineamiento de las secuencias del HBV presente en Colombia en el periodo 2002-2014 con respecto a la secuencia de referencia traducida NC_003977. Los sitios resaltados en negro corresponden a posiciones con variabilidad en el individuo. El sitio resaltado en amarillo corresponde a una mutación de escape. En el alineamiento solo se presentan los sitios variables.
*: codón de parada

de vida (37,38). En el 2016, se reportaron al Sivigila 38 muertes probables por hepatitis B (5). A pesar de la lucha para controlar la transmisión mediante la aplicación de una vacuna efectiva en la población expuesta y de la promoción de conocimientos, actitudes y prácticas que minimicen los factores de riesgo, esta enfermedad continúa siendo un problema para los nacidos antes de 1992 y para quienes no han sido vacunados, que, además, se convierten en una importante fuente de infección y transmisión.

El principal objetivo del presente estudio fue la caracterización molecular del HBV a partir de muestras de pacientes remitidas para diagnóstico y captadas mediante el sistema de vigilancia nacional por laboratorio de las hepatitis virales. A pesar

Cuadro1. Mutaciones de resistencia y escape en los genes P y S del HBV, Colombia, 2002-2014

Código de muestra*	Departamento	Año	Edad (años)	Sexo	Genotipo	Mutaciones de resistencia a antivirales en la RT		Mutaciones de escape HBsAg	
						HBV DRI	Geno2Pheno	HBV DRI	Geno2Pheno
10646	Cundinamarca	2002	43	M	F	No	No	No	No
48557	Meta	2002	22	M	A	No	No	No	No
48580	Guaviare	2002	48	M	A	No	No	No	No
48585	Meta	2002	64	M	F	No	No	No	No
48627	Guaviare	2002	44	M	F	No	No	No	No
48676	Casanare	2002	27	F	A	No	No	No	No
48732	Guaviare	2002	34	M	F	No	No	No	No
48739	Putumayo	2002	47	M	F	No	No	No	No
48794	Córdoba	2002	6	F	F	No	No	No	No
48817	Córdoba	2002	19	M	F	No	No	No	No
48875	Guaviare	2002	19	F	F	No	No	No	No
48877	Guaviare	2002	22	F	F	No	No	P120Q	No
49621	Boyacá	2003	25	M	F	No	No	No	No
49791	Cauca	2003	24	M	F	No	No	No	No
49793	Cauca	2003	36	M	F	No	No	No	No
49794	Cauca	2003	23	F	F	No	No	No	No
49884	Cundinamarca	2003	17	M	A	L180M (3TC, ETV, LdT) M204V (3TC, ETV, LdT)	L180M (3TC, ETV, LdT, Tyzeka®, Sebivo®) M204V (3TC, ETV, LdT, Tyzeka®, Sebivo®)	No	No
49887	Boyacá	2003	4	M	F	No	No	No	No
50418	Cauca	2004	19	M	F	No	No	No	No
50797	Córdoba	2004	31	M	F	No	No	No	No
50858	Cauca	2004	24	F	F	No	No	No	No
60265	Cesar	2004	51	M	F	I169L	I169L (ETV)	No	No
61048	Guainía	2005	20	M	F	No	No	No	No
61188	Guainía	2005	68	M	F	No	No	No	No
62233	Atlántico	2005	30	F	F	No	No	No	No
70874	Caldas	2009	39	M	F	No	No	No	No
72391	Guainía	2009	48	M	F	No	No	No	No
79446	Magdalena	2014	48	M	F	No	No	No	No

* Código interno del Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud
HBV-DRI: *HIV-grade HBV drug resistance interpretation*
M: masculino; F: femenino; LdT: telbivudina; 3TC: lamivudina; ETV: entecavir; FTC: emtricitabine

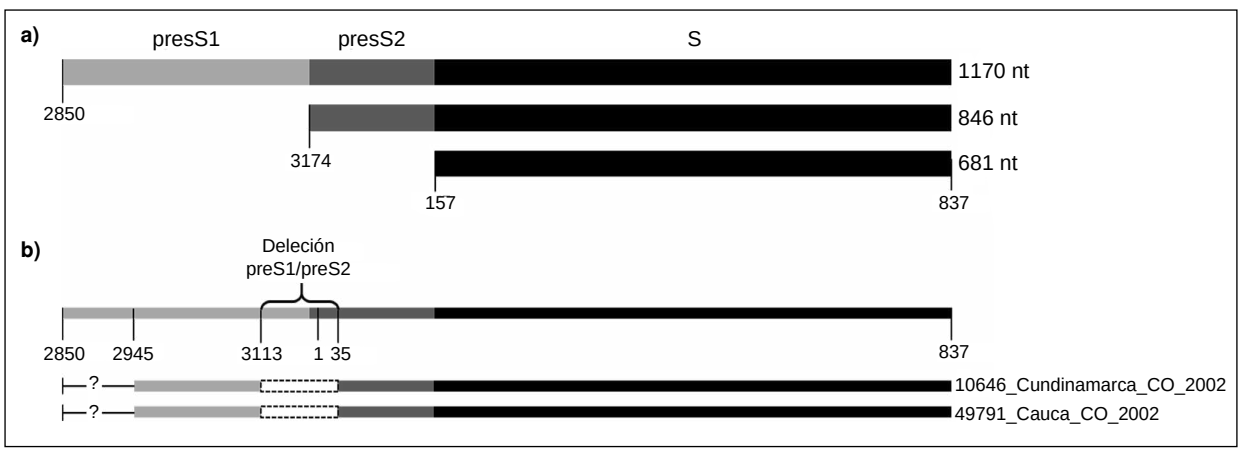

Figura 7. Región codificante de los antígenos de superficie del HBV. a) Representación gráfica de los antígenos de superficie grande (L-HBsAg), mediano (M-HBsAg) y pequeño (S-HBsAg) del HBV. b) Delimitación de la región correspondiente a la deleción presente en dos cepas del HBV colombianas. Las posiciones genómicas se calcularon con base en el genoma de referencia del HBV, número de acceso en GenBank NC_003977.2. La región delimitada con signo de interrogación no se pudo resolver en los electroferogramas obtenidos.

de que la PCR fue optimizada y la utilización de controles positivos permitió demostrar su correcto funcionamiento en todos los ensayos, el porcentaje de detección observado fue relativamente bajo (13,3 %) debido a la inclusión de muestras sin resultado confirmatorio del HBsAg mediante ensayo de neutralización; está documentado que existe un porcentaje de falsos positivos en los ensayos mediante la técnica ELISA debido a la unión inespecífica de antígenos. En 28 (42,4%) de las 66 muestras amplificadas, se lograron la secuenciación y el ensamblaje de la región genómica esperada. A pesar de que algunas muestras lograron amplificarse y secuenciarse parcialmente, se excluyeron por carecer de la región completa objeto del análisis, o por arrojar electroferogramas de baja resolución que impedían su correcto ensamblaje.

Los análisis filogenéticos del HBV han sido relevantes desde el punto de vista epidemiológico y clínico, pues han permitido rastrear el origen ancestral y reciente de los virus, estimar el tiempo de aparición de los diferentes genotipos y subgenotipos, establecer asociaciones entre los genotipos, las diferentes vías de transmisión y las manifestaciones clínicas de la enfermedad, y predecir la respuesta al tratamiento antiviral (21,39). Además, se han convertido en un complemento importante en el estudio de brotes para establecer la cadena de transmisión (40).

En el continente americano circula predominantemente el genotipo F; la información filogenética sugiere que este genotipo se originó en poblaciones amerindias de Norteamérica, Centroamérica y Suramérica hace 8.900 años, aproximadamente (42,43). El genotipo F se ha relacionado con una mayor frecuencia de carcinoma hepatocelular y muerte (44,45). Este genotipo se ha venido detectando en Colombia desde hace varias décadas y su mayor frecuencia se ha demostrado en diferentes estudios (8,16,17,46). En concordancia, los resultados del presente estudio mostraron que una alta proporción (85,7 %) de las muestras caracterizadas pertenecen al subgenotipo F3 del genotipo F. Asimismo, el genotipo A, cuyo origen en África se remonta a 9.600 años, aproximadamente, y el subgenotipo A2, establecido en Europa hace alrededor de 5.000 años (43), han alcanzado una amplia distribución mundial y se pudo identificar en el 14,3 % de las muestras caracterizadas. La circulación de este genotipo en el país había sido reportada en estudios previos (7,16) y el subgenotipo A2 se ha asociado con un mayor riesgo de progresión a la fase crónica de la enfermedad en la población japonesa (47).

Una de las principales limitaciones del presente estudio fue la imposibilidad de obtener información clínica de los pacientes, debido a que las fichas de notificación y las historias clínicas no suministraban la información completa; además, el periodo de estudio fue extenso, lo que impidió completar u obtener los datos clínicos. En este sentido, el estudio se limitó a la descripción de la diversidad de los virus que circularon en el país en el periodo de 2002 a 2014 y de la presencia de mutaciones en el HBV con relevancia epidemiológica.

En la actualidad existen diferentes medicamentos antivirales para el control de la infección por HBV. Sin embargo, la presión selectiva que representan los tratamientos antivirales, la alta tasa de sustitución de nucleótidos del HBV ($4,57 \times 10^{-5}$ sustituciones/nucleótido/año) (48) y el elevado grado de replicación (10^{12} viriones/día) (49), son factores determinantes que favorecen la aparición de mutaciones de resistencia.

El alto costo de los tratamientos antivirales disponibles y la necesidad de conocer *a priori* la existencia de mutaciones de resistencia, justifican el estudio de la variabilidad genética de las cepas del HBV que circulan en el país, con el fin de predecir la efectividad de los diferentes tratamientos y contribuir con información útil para la adopción de decisiones.

Teniendo en cuenta que las muestras analizadas en el presente estudio fueron remitidas para el diagnóstico de pacientes con sospecha de hepatitis viral, se puede inferir que estos no habían recibido tratamiento antiviral. Por lo tanto, la identificación de dos mutaciones de resistencia (L180M y M204V) de forma simultánea en el HBV de la muestra proveniente de un paciente de Cundinamarca, sugiere que este adquirió la infección a partir del contacto con un individuo previamente tratado con LdT, 3TC, ETV o emtricitabine (FTC). La mutación I169L en el dominio RT del HBV se identificó en una muestra procedente del departamento del Cesar; aunque es más frecuente encontrar la mutación I169T en dicho dominio, y esta se ha asociado claramente con resistencia a ETV, la presencia de leucina en esta posición podría estar relacionada también con dicha resistencia, y es así como fue interpretada por las herramientas en línea HBV DRI y Geno2Pheno.

Por último, se estima que el surgimiento de variantes de escape en la secuencia que codifica el determinante “a” o en regiones cercanas, tendrá importantes implicaciones en salud pública (23,50). Estas mutaciones están relacionadas principalmente con el escape frente a la neutralización por parte de los anticuerpos generados tras la inmunización con la vacuna, o por infección natural por el HBV, y podrían tener un impacto negativo en el diagnóstico mediante pruebas serológicas basadas en la detección del HBsAg (23,51).

En el análisis de las secuencias del gen S del HBV, se identificó la mutación P120Q en la muestra de un paciente proveniente del departamento del Guaviare, la cual fue reactiva para el HBsAg con el método ELISA. Dicha mutación se ha relacionado con una reacción disminuida en diferentes ensayos serológicos comerciales, como el Vitros ECi HBsAg™ (Ortho-Clinical Diagnostics, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) y el Auszyme Dynamic™ (Abbott Laboratories, North Chicago, USA) (52,53). Asimismo, se reportó la aparición de esta mutación en un paciente recién nacido de una madre infectada en Corea, a quien se le había administrado de forma simultánea la vacuna y el tratamiento profiláctico con inmunoglobulina (54).

En la región preS/S comúnmente se presentan deleciones (55) y mutaciones puntuales (56), las cuales se han asociado con falla hepática aguda, cirrosis y hepatitis colestásica ‘fibrosante’ (22,57,58). En el presente estudio, dos de las muestras correspondientes al periodo de 2002 a 2003 presentaron una deleción en la región preS1-preS2, cuyas implicaciones bológicas y clínicas se estudiarán y discutirán en estudios posteriores.

El presente estudio permitió corroborar la circulación en Colombia de los genotipos y subgenotipos F3 y A2 del HBV, así como la circulación predominante del subgenotipo F3. Se identificaron las mutaciones L180M y M204V de resistencia a los medicamentos antivirales, cuya presencia simultánea en la secuencia se detectó en la muestra proveniente de un mismo paciente; en la secuencia de otro paciente, se identificó la mutación I169L, la cual también podría conferir resistencia antiviral. En la región codificante del HBsAg, se identificó la mutación P120Q, la cual se ha considerado como variante de escape. Además, se encontró una deleción de 105 nucleótidos que se extendían a la región codificante de preS1 y de preS2, cuyas implicaciones biológicas y clínicas se desconocen.

El presente estudio constituye un aporte a la epidemiologia molecular del HBV en Colombia y a la identificación de mutaciones asociadas con resistencia a los medicamentos antivirales y con mutaciones de escape en las regiones codificantes S y el dominio RT de la polimerasa, lo cual constituye una información valiosa para la adopción de decisiones durante el proceso de elección y seguimiento de la efectividad de los tratamientos antivirales.

Agradecimientos

A la Unidad de Secuenciación y Genómica del Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud, al Programa Nacional de Ciencia y Tecnología en Salud del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias, y a la Asociación Colombiana para el Avance de la Ciencia, ACAC.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiación

El presente estudio fue financiado por el Convenio de cooperación entre Colciencias y el Instituto Nacional de Salud No. 769-2013, Código de proyecto: 2104-569-35036.

Referencias

1. **Dienstag JL.** Hepatitis B virus infection. N Engl J Med. 2008; 359:1486-500. https://doi.org/10.1056/NEJMra0801644
2. **Paganelli M, Stephenne X, Sokal EM.** Chronic hepatitis B in children and adolescents. J Hepatol. 2012;57:885-96. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.03.036
3. **World Health Organization.** Hepatitis B. Fact sheet. 2016. Fecha de consulta: 1° de julio de 2017. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/
4. **Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ.** Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: A systematic review of data published between 1965 and 2013. Lancet. 2015;386:1546-55. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61412-X
5. **Instituto Nacional de Salud.** Sivigila. Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica No. 52 de 2016. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2016. Fecha de consulta: 22 de febrero de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2016%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2052%20-.pdf
6. **Alvarado-Mora MV, Fernández MF, Gomes-Gouvêa MS, de Azevedo-Neto RS, Carrilho FJ, Pinho JR.** Hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV) and hepatitis delta (HDV) viruses in the Colombian population--how is the epidemiological situation? PLoS One. 2011;6:e18888. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018888

7. **Ríos-Patiño D, di Filippo VD, Insuasty EM, Rendón JC, Ríos WA, Medina LC, *et al*.** Hepatitis B infections in individuals with exposure factors in Quibdó and Apartadó, Colombia. Rev Colomb Gastroenterol. 2015;30:11-8.

8. **Di Filippo-Villa D, Cortés-Mancera F, Payares E, Montes N, de la Hoz F, Arbeláez MP, *et al*.** Hepatitis D virus and hepatitis B virus infection in Amerindian communities of the Amazonas state, Colombia. Virol J. 2015;12:172. https://doi.org/10.1186/s12985-015-0402-5

9. **Beltrán M, Navas MC, Arbeláez MP, Donado J, Jaramillo S, De la Hoz F, *et al*.** Seroprevalence of hepatitis B virus and human immunodeficiency virus infection in a population of multiply-transfused patients in Colombia, Sur América. Biomédica. 2009;29:232-43. https://doi.org/10.7705/biomedica.v29i2.25

10. **Seeger C, Zoulim F, Mason WS.** Hepadnaviruses. In: Knipe D, Howley P, editors. Fields virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 2185-221.

11. **Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarría JM, Lee SD, Mushahwar IK, *et al*.** Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. Intervirology. 2004;47:289-309. https://doi.org/10.1159/000080872

12. **Shi W, Zhang Z, Ling C, Zheng W, Zhu C, Carr MJ, *et al*.** Hepatitis B virus subgenotyping: History, effects of recombination, misclassifications, and corrections. Infect Genet Evol. 2013;16:355-61. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.021

13. **Bautista-Amorocho H, Castellanos-Domínguez YZ, Rodríguez-Villamizar LA, Velandia-Cruz SA, Becerra-Peña JA, Farfán-García AE.** Epidemiology, risk factors and genotypes of HBV in HIV-infected patients in the northeast region of Colombia: High prevalence of occult hepatitis B and F3 subgenotype dominance. PLoS One. 2014;9:e114272. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114272

14. **Cortés-Mancera F, Loureiro CL, Hoyos S, Restrepo JC, Correa G, Jaramillo S, *et al*.** Etiology and viral genotype in patients with end-stage liver diseases admitted to a hepatology unit in Colombia. Hepat Res Treat. 2011;2011:363205. https://doi.org/10.1155/2011/363205

15. **Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutiérrez MF, Carrilho FJ, Pinho JR.** Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus genotype E in an isolated Afro-Colombian community. J Gen Virol. 2010;91:501-8. https://doi.org/10.1099/vir.0.015958-0

16. **Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutiérrez MF, Botelho L, Carrilho FJ, *et al*.** Molecular characterization of the hepatitis B virus genotypes in Colombia: A Bayesian inference on the genotype F. Infect Genet Evol. 2011;11:103-8. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.10.003

17. **Devesa M, Loureiro CL, Rivas Y, Monsalve F, Cardona N, Duarte MC, *et al*.** Subgenotype diversity of hepatitis B virus American genotype F in Amerindians from Venezuela and the general population of Colombia. J Med Virol. 2008;80:20-6. https://doi.org/10.1002/jmv.21024

18. **Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutiérrez MF, Carrilho FJ, Pinho JR.** Phylogenetic analysis of complete genome sequences of hepatitis B virus from an Afro-Colombian community: Presence of HBV F3/A1 recombinant strain. Virol J. 2012;9:244. https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-244

19. **Rendón JC, Cortés-Mancera F, Duque-Jaramillo A, Ospina MC, Navas MC.** Analysis of hepatitis B virus genotypes by restriction fragment length polymorphism. Biomédica. 2016;36:79-88. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2976

20. **Kramvis A.** Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. Intervirology. 2014;57:141-50. https://doi.org/10.1159/000360947

21. **Tong S, Revill P.** Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. J Hepatol. 2016;64(Suppl.):S4-16. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.027

22. **Fan YF, Lu CC, Chen WC, Yao WJ, Wang HC, Chang TT, *et al*.** Prevalence and significance of hepatitis B virus (HBV) pre-S mutants in serum and liver at different replicative stages of chronic HBV infection. Hepatology. 2001;33:277-86. https://doi.org/10.1053/jhep.2001.21163

23. **Jaramillo CM, Navas MC.** Variantes de escape del virus de la hepatitis B. Rev Chil Infectol. 2015;32:190-7. https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000300008

24. **Biswas S, Candotti D, Allain JP.** Specific amino acid substitutions in the S protein prevent its excretion *in vitro* and may contribute to occult hepatitis B virus infection. J Virol. 2013;87:7882-92. https://doi.org/10.1128/JVI.00710-13

25. **Coleman PF.** Surveillance for hepatitis B surface antigen mutants. J Med Virol. 2006;78(Suppl.1):S56-8. https://doi.org/10.1002/jmv.20609/abstract

26. **Stuyver L, De Gendt S, van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, *et al*.** A new genotype of hepatitis B virus: Complete genome and phylogenetic relatedness. J Gen Virol. 2000;81:67-74. https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-1-67

27. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013;30:2725-9. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197

28. **Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D.** jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. Nat Methods. 2012:9;772. https://doi.org/10.1038/nmeth.2109

29. **Rhee SY, Margeridon-Thermet S, Nguyen MH, Liu TF, Kagan RM, Beggel B, *et al*.** Hepatitis B virus reverse transcriptase sequence variant database for sequence analysis and mutation discovery. Antiviral Res. 2010;88:269-75. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.09.012

30. **Beggel B, Neumann-Fraune M, Doring M, Lawyer G, Kaiser R, Verheyen J, *et al*.** Genotyping hepatitis B virus dual infections using population-based sequence data. J Gen Virol. 2012;93:1899-907. https://doi.org/10.1099/vir.0.043042-0

31. **Mukaide M, Tanaka Y, Shin IT, Yuen MF, Kurbanov F, Yokosuka O, *et al*.** Mechanism of entecavir resistance of hepatitis B virus with viral breakthrough as determined by long-term clinical assessment and molecular docking simulation. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:882-9. https://doi.org/10.1128/AAC.01061-09

32. **He X, Wang F, Huang B, Chen P, Zhong L.** Detection and analysis of resistance mutations of hepatitis B virus. Int J Clin Exp Med. 2015;8:9630-9.

33. **Rendón JC, Cortés-Mancera F, Restrepo-Gutiérrez JC, Hoyos S, Navas MC.** Molecular characterization of occult hepatitis B virus infection in patients with end-stage liver disease in Colombia. PLoS One. 2017;12:e0180447. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180447

34. **Kim DY, Chang HY, Lim SM, Kim SU, Park JY, Kim JK, *et al*.** Quasispecies and pre-existing drug-resistant mutations of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B. Gut Liver. 2013;7:329-34. https://doi.org/10.5009/gnl.2013.7.3.329

35. **Beltrán M, Berrío-Pérez M, Bermúdez MI, Rey-Benito G, Camacho B, Forero P, *et al*.** Detección de hepatitis B oculta en donantes de bancos sangre,Colombia 2008-2009. Biomédica. 2011;31:580-9. https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i4.446

36. **de la Hoz F.** Comportamiento de la notificación por Sivigila para hepatitis B, 1997-2001. Inf Quinc Epidemiol Nac. 2001;6:253-68.

37. **Idrovo-Cubides V, Suárez Q CY, Álvarez-Quintero P.** Epidemiología e historia natural de la hepatitis B. Rev Colomb Gastroenterol. 2009;24:4s-12s.

38. **Beltrán O, Varón A, Restrepo JC.** Hepatitis B postrasplante. Rev Colomb Gastroenterol. 2009;24(Supl.1):33-8S.

39. **Kramvis A, Kew MC.** Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. J Viral Hepat. 2005;12:456-64. https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2005.00624.x/abstract

40. **Tolosa N, Cuéllar C, Quijada H, Pacheco OE, Escalante M, Usme-Ciro JA, *et al*.** Estudio de conglomerado de casos de hepatitis B en el Establecimiento Penitenciario de Mediana y Alta Seguridad (EPMAS) "Doña Juana", municipio La Dorada (Caldas), año 2014. Inf Quinc Epidemiol Nac. 2016;21:216-37.

41. **Mohanty K.** The first case of criminalization of transmission of hepatitis B in the UK: Defendant sentenced to two years' imprisonment on the grounds of hepatitis B deoxyribonucleic acid sequencing. Int J STD AIDS. 2009;20:587-9. https://doi.org/10.1258/ijsa.2008.008483

42. **Campos RH, Mbayed VA, Pineiro YL.** Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. J Clin Virol. 2005;34(Suppl.2):S8-s13. https://doi.org/10.1016/S1386-6532(05)80028-9

43. **Paraskevis D, Magiorkinis G, Magiorkinis E, Ho SY, Belshaw R, Allain JP, *et al*.** Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates. Hepatology. 2013;57:908-16. https://doi.org/10.1002/hep.26079

44. **Livingston SE, Simonetti JP, McMahon BJ, Bulkow LR, Hurlburt KJ, Homan CE, *et al*.** Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: Preponderance of genotype F. J Infect Dis. 2007;195:5-11. https://doi.org/10.1086/509894

45. **Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J.** Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. Gastroenterology. 2002;123:1848-56. https://doi.org/10.1053/gast.2002.37041

46. **Norder H, Courouce AM, Magnius LO.** Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. Virology. 1994;198:489-503. https://doi.org/10.1006/viro.1994.1060

47. **Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, Yamada G, Murawaki Y, Komatsu M, *et al*.** Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. J Clin Microbiol. 2009;47:1476-83. https://doi.org/10.1128/JCM.02081-08

48. **Orito E, Mizokami M, Ina Y, Moriyama EN, Kameshima N, Yamamoto M, *et al*.** Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. Proc Natl Acad Sci USA. 1989;86:7059-62.

49. **Girones R, Miller RH.** Mutation rate of the hepadnavirus genome. Virology. 1989;170:595-7.

50. **Waters JA, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W, *et al*.** Loss of the common "A" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. J Clin Invest. 1992;90:2543-7. https://doi.org/10.1172/JCI116148

51. **Carman WF, Korula J, Wallace L, MacPhee R, Mimms L, Decker R.** Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant that escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA. Lancet. 1995;345:1406-7.

52. **Avellón A, Echevarría JM.** Frequency of hepatitis B virus 'a' determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. J Med Virol. 2006;78:24-36. https://doi.org/10.1002/jmv.20516/abstract

53. **Kfoury-Baz EM, Zheng J, Mazuruk K, van Le A, Peterson DL.** Characterization of a novel hepatitis B virus mutant: Demonstration of mutation-induced hepatitis B virus surface antigen group specific "a" determinant conformation change and its application in diagnostic assays. Transfus Med. 2001;11:355-62. https://doi.org/10.1046/j.1365-3148.2001.00323.x

54. **Lee KM, Kim YS, Ko YY, Yoo BM, Lee KJ, Kim JH, *et al*.** Emergence of vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus with multiple surface gene mutations in a Korean child. J Korean Med Sci. 2001;16:359-62. https://doi.org/10.3346/jkms.2001.16.3.359

55. **Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS.** High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. Gastroenterology. 2006;130:1153-68. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.01.011

56. **Pollicino T, Amaddeo G, Restuccia A, Raffa G, Alibrandi A, Cutroneo G, *et al*.** Impact of hepatitis B virus (HBV) preS/S genomic variability on HBV surface antigen and HBV DNA serum levels. Hepatology. 2012;56:434-43. https://doi.org/10.1002/hep.25592

57. **Zhang D, Dong P, Zhang K, Deng L, Bach C, Chen W, *et al*.** Whole genome HBV deletion profiles and the accumulation of preS deletion mutant during antiviral treatment. BMC Microbiol. 2012;12:307. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-307

58. **Santantonio T, Jung MC, Schneider R, Fernholz D, Milella M, Monno L, *et al*.** Hepatitis B virus genomes that cannot synthesize pre-S2 proteins occur frequently and as dominant virus populations in chronic carriers in Italy. Virology. 1992;188:948-52. https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90559-8

Biomédica 2018;38:51-8
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3938

ARTÍCULO ORIGINAL

Detección molecular de leptospiras patógenas en roedores sinantrópicos y silvestres capturados en Yucatán, México

Marco Torres-Castro[1], Bayron Cruz-Camargo[1], Rodrigo Medina-Pinto[2], Bibiana Reyes-Hernández[1], Carlos Moguel-Lehmer[3], Rolando Medina[4], José Ortiz-Esquivel[2], William Arcila-Fuentes[2], Armando López-Ávila[1], Henry Noh-Pech[1], Alonso Panti-May[5], Iván Rodríguez-Vivas[2], Fernando I. Puerto[1]

[1] Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México
[2] Departamento de Salud Animal y Medicina Preventiva, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México
[3] Proyecto "Savia", Secretaría de Investigación, Innovación y Educación Superior, Mérida, México
[4] Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México
[5] Doctorado en Ciencias Agropecuarias, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México

Introducción. La leptospirosis es una enfermedad zoonótica endémica en México, ocasionada por la bacteria del género *Leptospira,* la cual constituye un problema de salud pública y veterinaria. Los roedores son los reservorios más relevantes de *Leptospira* spp., debido a que la bacteria se establece y se reproduce en su tejido renal y es excretada por la orina.
Objetivo. Identificar la presencia de *Leptospira* spp. en tejido renal de roedores capturados en Yucatán, México.
Materiales y métodos. Se capturaron roedores sinantrópicos y silvestres en el municipio rural de Cenotillo, Yucatán, México. Se tomó un riñón de cada roedor y se extrajo el ADN total. La identificación de *Leptospira* spp. se hizo mediante la detección de dos fragmentos del gen 16S rRNA con una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final. Los productos positivos se secuenciaron y se analizaron con herramientas de alineamiento.
Resultados. Se capturaron 92 roedores pertenecientes a siete especies distintas. La PCR arrojó 5,4 % (5/92) de positividad global. El análisis del alineamiento de los aislamientos de los roedores infectados demostró 100 % de cobertura e identidad con la especie *Leptospira interrogans*. Esta es la primera evidencia molecular de la circulación de *Leptospira* spp. en *Heteromys gaumeri* capturados en Yucatán, México.
Conclusión. Se evidenció que los roedores de Yucatán, México, son reservorios de *Leptospira* spp. y participan en el ciclo de infección de la leptospirosis en la región.

Palabras clave: *Leptospira* spp.; roedores; enfermedades de los roedores; México.

https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3938

Molecular detection of pathogenic *Leptospira* in synanthropic and wild rodents captured in Yucatán, México

Introduction: Leptospirosis is a zoonotic disease caused by bacteria of the genus *Leptospira*, which is endemic in México and considered a public and veterinary health problem. Rodents are the most relevant reservoirs of *Leptospira* spp. because the bacteria establish and reproduce in its renal tissue and are excreted through the urine.
Objective: To identify the presence of *Leptospira* spp. in renal tissue from rodents captured in Yucatán, México.
Materials and methods: Synanthropic and wild rodents were captured in the rural municipality of Cenotillo, Yucatán, México. We collected one kidney from each rodent and extracted the total DNA.

Contribución de los autores:
Marco Torres-Castro: dirección del estudio, captura de roedores, toma de muestras biológicas y escritura del manuscrito
Bayron Cruz Camargo, Bibiana Reyes-Hernández, Carlos Moguel-Lehmer, Armando López-Ávila y Henry Noh-Pech: diagnóstico de laboratorio e interpretación de resultados
Bayron Cruz-Camargo, Rodrigo Medina-Pinto, Rolando Medina, José Ortiz-Esquivel y William Arcila-Fuentes: captura de roedores y toma de muestras biológicas
Alonso Panti-May: interpretación de resultados y análisis de secuencias
Iván Rodríguez-Vivas y Fernando I. Puerto: coordinación general de actividades
Todos los autores revisaron la versión final del manuscrito.

The identification of *Leptospira* spp. was done by detecting two fragments of the 16S rRNA gene using end-point polymerase chain reaction (PCR). We sequenced and analyzed positive products using alignment tools.
Results: A total of 92 rodents belonging to seven different species were captured. The PCR yielded a global positivity of 5.4% (5/92). The alignment analysis of the sequenced products demonstrated a 100% of coverage and identity with *Leptospira interrogans*. This is the first molecular evidence of *Leptospira* spp. circulation in *Heteromys gaumeri* captured in Yucatán, México.
Conclusion: Our results evidenced that rodents of Yucatán are reservoirs of *Leptospira* spp. and participate in the infection cycle of leptospirosis in the region.

Key words: *Leptospira* spp.; rodents; rodent diseases; México.

https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3938

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial, ocasionada por bacterias espiroquetas patógenas pertenecientes al orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae, género *Leptospira*. Se dividen en 22 especies clasificadas en tres grupos: patógenas, intermedias y saprófitas o de vida libre, de las cuales las patógenas e intermedias tienen mayor importancia debido a su capacidad de ocasionar desde una amplia gama de signos o síntomas clínicos similares a los de un resfriado común, hasta un daño funcional multiorgánico y la muerte (1,2).

La enfermedad es más frecuente en regiones con climas tropicales o subtropicales, al igual que en zonas que presentan inundaciones o precarias condiciones higiénicas y sanitarias (3). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado la leptospirosis como una de las enfermedades reemergentes y desatendidas (4).

Diversos animales domésticos y silvestres, así como accidentalmente el humano, están involucrados en el ciclo de infección de la leptospirosis; sin embargo, los reservorios de mayor relevancia son los pequeños mamíferos silvestres o sinantrópicos pertenecientes al orden Rodentia (1). Estos animales constituyen la fuente de infección más importante para los humanos y otros huéspedes vertebrados sensibles, los cuales se infectan principalmente por el contacto directo o indirecto con orina de roedores que contenga leptospiras viables (2).

Correspondencia:
Marco Torres-Castro, Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Avenida Itzáes N° 409 por calle 59, Col. Centro, Mérida, Yucatán, México, C.P. 97000
Teléfono: (999) 924 5809 y (999) 923 6120
antonio.torres@correo.uady.mx

Recibido: 29/06/17; aceptado: 21/02/18

En México la leptospirosis se cataloga como un problema de salud pública y veterinaria, reportándose distintas tasas de incidencia y prevalencia en todo el territorio nacional. La leptospirosis humana se ha reportado en 27 de los 32 estados que conforman el país, en los cuales los brotes se presentan de manera ocasional (4).

En estudios previos en Yucatán, se ha reportado que los roedores capturados en el peridomicilio son reservorios de leptospiras patógenas (5,6). Asimismo, en otros animales silvestres, como las zarigüeyas (7), y en los domésticos, como cerdos, vacas y perros, la infección también se ha documentado (8,9). Sin embargo, no se han hecho estudios en roedores silvestres de las áreas rurales de Yucatán, por lo que el objetivo de esta investigación fue determinar la circulación de *Leptospira* spp. en el tejido renal de roedores sinantrópicos y silvestres capturados en un ambiente urbano y en otro selvático de Yucatán empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis de alineamiento.

Materiales y métodos

Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en la comunidad rural de Cenotillo (paralelos 20° 55' y 21° 09' de latitud norte y los meridianos 88° 26' y 88° 48' de longitud oeste), ubicada al este de Yucatán y a 107 km de Mérida, capital del Estado. Cuenta con una población de 3.701 habitantes, repartidos en casas construidas con materiales duraderos y perecederos, como piedra, cartón, lámina, madera y paja. El clima de la región es cálido subhúmedo, con una temperatura media anual de 26,3 °C. La precipitación promedio anual es de 1.200 mm, y las lluvias se presentan generalmente en los meses de mayo y julio (10).

El suelo es principalmente para uso agropecuario (agricultura y ganadería) y, menos frecuentemente, para asentamientos urbanos. La vegetación predominante en las zonas aledañas a la localidad

es de selva baja caducifolia, con pequeñas extensiones de selva mediana subperennifolia en la que se observan parches de pasto forrajero. La fauna endémica está constituida por pequeños mamíferos como roedores, ardillas, mapaches, coatíes y tejones, así como diversas clases de reptiles y aves (10).

En la comunidad de estudio se pudieron observar numerosos perros y gatos deambulando en los predios y las calles, así como grandes cantidades de desechos orgánicos e inorgánicos.

Captura de roedores

Los roedores fueron capturados entre julio y noviembre de 2016 en viviendas de la localidad de estudio (sinantrópicos) y en extensiones de los parches de selva sin intervención antropogénica (silvestres) ubicadas a 9 km del sitio de estudio. El muestreo se hizo siguiendo los lineamientos de la *American Society of Mammalogists* (ASM) (11) y otras especificaciones nacionales (12).

Para la captura de los roedores sinantrópicos, el asentamiento urbano se dividió en cuatro cuadrantes trazando dos ejes perpendiculares en el centro de la población. En cada cuadrante se seleccionaron por conveniencia diez casas (40 en total) y, allí, se recogieron las muestras en dos noches consecutivas durante dos semanas de cada mes. En cada vivienda se colocaron doce trampas Sherman (8 x 9 x 23 cm; H.B. Sherman Traps Inc.™; Tallahassee, Florida, Estados Unidos), distribuidas en el interior y en el patio, ubicadas cerca de lugares con evidencia de actividad o presencia de roedores y de potenciales fuentes de alimentación o alojamiento, previo consentimiento de los dueños u ocupantes.

Para el muestreo de las extensiones de selva, se distribuyeron 100 trampas Sherman a lo largo de diez transectos lineales, poniendo una trampa cada 8 a 9 metros. La captura se hizo en los mismos días y semanas que en los cuadrantes urbanos. Todas las trampas empleadas se colocaron en la mañana y se revisaron 24 horas después. El cebo utilizado fue una mezcla de hojuelas de avena y saborizante artificial de vainilla.

El presente estudio contó con la aprobación del Comité de Bioética del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán (clave de registro: CB-CCBA-M-2016-004) y de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (registro N° SGPA/DGVS/00867/17) de México.

Toma de muestras biológicas

Todos los roedores capturados fueron trasladados a una estación de campo habilitada para su procesamiento. Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (130 mg/kg) y se les practicó la eutanasia por dislocación cervical, según los lineamientos de la *American Veterinary Medical Association* (13).

Después de la eutanasia, se registraron los datos somáticos, la especie, el sexo, la edad (en ratones subadultos: ≤8 g, en adultos: >8 g; en ratas subadultas: ≤66 g, en adultas: >66 g) y el estado reproductivo de todos los individuos, el cual se consideró como “maduro” en hembras gestantes (embriones visibles), lactantes, o en las que tenían el orificio vaginal abierto, y como “inmaduro” cuando el orificio vaginal estaba cerrado. En machos, el estado “maduro” se determinó por la presencia de testículos no descendidos.

La identificación de las especies estuvo a cargo de médicos veterinarios con experiencia en muestreos y estudios poblacionales de roedores en la península de Yucatán. Además, se hicieron necropsias para recolectar las muestras biológicas (riñones), las cuales se depositaron en tubos para microcentrífuga de 1,5 ml (Eppendorf™; Hamburgo, Alemania) embebidos en alcohol al 96 % y conservados a -70 °C, hasta su empleo en la extracción del ADN total (hebra molde). Para evitar contaminaciones cruzadas, todo el instrumental empleado en la toma de muestras fue previamente desinfectado con alcohol y cloruro de benzalconio al 10 %.

Extracción del ADN total e identificación molecular de Leptospira spp.

Antes de la extracción de los ácidos nucleicos, los riñones se lavaron con agua bidestilada durante cinco minutos, aproximadamente, para retirar el exceso de alcohol. El ADN total se extrajo directamente del tejido renal con ayuda del estuche QIAamp DNA Mini Kit™ (QIAGEN; Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo *DNA Purification from Tissues* y según las especificaciones del fabricante.

Todas las extracciones se hicieron en una campana de flujo laminar (Labconco™; Kansas City, Estados Unidos). Para la cuantificación y la evaluación del ADN total extraído, se empleó un espectrofotómetro (NanoDrop 2000™, ThermoScientific, Wilmington, Estados Unidos). La hebra molde de ADN se conservó a -70 °C hasta su empleo en la reacción molecular.

La detección molecular de *Leptospira* spp. se hizo mediante dos PCR de punto final, según la metodología de Torres-Castro, *et al*. (5,6). En la primera reacción, la cual se utilizó en todas las extracciones de ADN, se usaron los oligonucleótidos 16S3 (sentido) (14) y 16SR (antisentido) (15), que amplifican un fragmento esperado de 150 pb perteneciente al gen 16S ribosómico de *Leptospira* spp. (16S rRNA).

Con el objetivo de corroborar los resultados positivos de la reacción anterior, se hizo una segunda PCR en la cual se sustituyó el oligonucleótido 16S3 con el 16S5 (sentido) (14) y se conservó el oligonucleótido 16SR (antisentido) (15), los cuales amplifican un tamaño aproximado de 1.004 pb perteneciente también al gen 16SrRNA. Este gen es el más empleado y aceptado para el estudio y la identificación molecular de leptospiras patógenas y se encuentra muy conservado en todas las especies (patógenas, intermedias y saprófitas) (16).

Los reactivos utilizados en ambas reacciones tuvieron las siguientes concentraciones finales: solución tampón de PCR 5X; 2,5mM de $MgCl^2$; 0,2 mM de deoxinucleósido trifosfato (dNTP); 0,2 mM de cada cebador; 1U de Taq polimerasa (ThermoScientific Inc.; Massachusetts, Estados Unidos) y agua bidestilada cbp. Se emplearon 4 ml de hebra molde de ADN para un volumen final de 25 ml.

Las condiciones en el termociclador para ambas reacciones fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante cinco minutos, seguido de 34 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, 94 °C durante un minuto y 72 °C durante dos minutos; la extensión final fue a 72 °C durante cinco minutos.

Para todas las reacciones, se incluyeron un control positivo (extracción de ADN de un cultivo de *Leptospira* patógena donado por el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán) y un control negativo (agua estéril). La electroforesis de los productos de la PCR se hicieron en geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio, y se visualizaron en un fotodocumentador (Bio-Rad; California, Estados Unidos).

Purificación y análisis del alineamiento

Los productos amplificados de 150 pb (correspondientes a la primera reacción) se retiraron del gel de agarosa al 1 % con ayuda de un bisturí estéril y, posteriormente, se purificaron con el estuche comercial Zymoclean Gel DNA Recovery™ (Zymo-Research; California, Estados Unidos), según las especificaciones del fabricante. Los cinco productos purificados fueron enviados para su secuenciación al laboratorio DIMYGEN™ (Mérida, Yucatán, México; http://www.dimygen.com/). Las secuencias obtenidas se compararon con otras previamente depositadas en el GenBank, empleando la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del *National Institutes of Heatlh* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), con el fin de determinar y comparar su identidad y similitud.

Resultados

Captura de roedores

Se capturaron 92 individuos pertenecientes a siete especies distintas: 25 (27,2 %) *Rattus rattus*, 25 (27,2 %) *Mus musculus*, 22 (23,9 %) *H. gaumeri*, 10 (10,9 %) *Ototylomys phyllotis*, 8 (8,8 %) *Peromyscus yucatanicus*, 1 (1,0 %) *Peromyscus leucopus* y 1 (1,0 %) *Sigmodon hispidus*. En el medio urbano se capturaron 48 (52,2 %) roedores: 24 (50 %) *M. musculus* y 24 (50 %) *R. rattus,* en tanto que, en el medio silvestre, se capturaron 44 (47,8 %): 22 (50 %) *H. gaumeri*, 10 (22,7 %) *O. phyllotis*, 8 (18,1 %) *P. yucatanicus*, 1 (2,3 %) *P. leucopus*, 1 (2,3 %) *S. hispidus*, 1 (2,3 %) *R. rattus* y 1 (2,3 %) *M. musculus*. Las frecuencias de las edades, sexos y estados reproductivos de los individuos pertenecientes a cada especie, se presentan en el cuadro 1.

Identificación molecular de Leptospira spp.

La prueba molecular arrojó una frecuencia positiva global de 5,4 % (5/92). De este porcentaje, 2 de 5 correspondió a *R. rattus*, otros 2 de 5 a *M. musculus* y 1 de 5 a *H. gaumeri*. Cuatro de 5 de los individuos positivos eran hembras y 1 de 5 era macho. Todos los roedores positivos eran adultos. En la figura 1 se muestra el gel representativo con algunos de los productos de PCR positivos. La frecuencia de infección por especie fue de 8 % (2/25) para *R. rattus*, 8 % (2/25) para *M. musculus* y 4,5 % (1/22) para *H. gaumeri*.

Análisis de alineamiento

El análisis de alineamiento con la herramienta BLAST arrojó coberturas e identidades del 100 % con respecto a la especie patógena *L. interrogans,* las cuales resultaron cercanas a los serovares Copenhageni, Canicola e Icterohaemorragiae.

Cuadro 1. Número y frecuencias correspondientes a sexo, edad y estado reproductivo de los roedores sinantrópicos y silvestres capturados en la comunidad rural de Cenotillo, Yucatán, México

Especie	Sexo		Edad		Estado reproductivo	
	Hembra n (%)	Macho n (%)	Subadulto n (%)	Adulto n (%)	Inmaduro n (%)	Maduro n (%)
Rattus rattus	18 (19,6)	7 (7,6)	4 (4,3)	21 (22,9)	4 (4,3)	21 (22,9)
Mus musculus	11 (12)	14 (15,2)	14 (15,2)	11 (12)	14 (15,2)	11 (12)
Heteromys gaumeri	14 (15,2)	8 (8,7)	10 (10,9)	12 (13)	10 (10,9)	12 (13)
Ototylomys phyllotis	5 (5,4)	5 (5,4)	1 (1,1)	9 (9,8)	1 (1,1)	9 (9,8)
Peromyscus yucatanicus	6 (6,5)	2 (2,2)	4 (4,3)	4 (4,3)	4 (4,3)	4 (4,3)
Peromyscus leucopus	1 (1,1)	0 (0)	1 (1,1)	0 (0)	1 (1,1)	0 (0)
Sigmodon hispidus	1 (1,1)	0 (0)	0 (0)	1 (1,1)	0 (0)	1 (1,1)
Total (%)	56 (60,9)	36 (39,1)	34 (36,9)	58 (63,1)	58 (36,9)	34 (63,1)

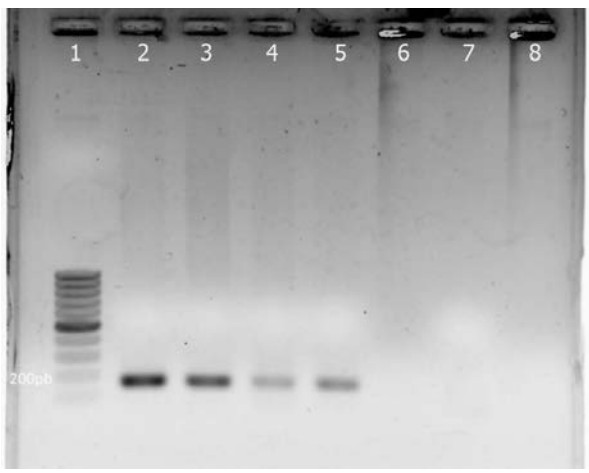

Figura 1. Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. Se observan algunas amplificaciones de 150 pb positivas para el gen 16S rRNA de *Leptospira interrogans* en roedores sinantrópicos y silvestres de Yucatán, México.
1: marcador de peso molecular de 100 pb; 2: muestra positiva de *H*. *gaumeri*; 3: muestra positiva de *R*. *rattus*; 4: muestra positiva de *M*. *musculus*; 5: control positivo; 6: control negativo; 7 y 8: vacíos.

Discusión

En años recientes, se ha presentado en Yucatán un incremento significativo en el número de investigaciones epidemiológicas sobre agentes infecciosos con importancia en salud pública y veterinaria, en las que se ha establecido que los roedores sinantrópicos y silvestres son reservorios o portadores asintomáticos (17). Asimismo, en estudios poblacionales y ecológicos se ha comprobado que las especies sinantrópicas *M*. *musculus* y *R*. *rattus* son las más importantes y abundantes en ambientes urbanos y periurbanos de Yucatán, lo cual se debe a factores como la presencia de numerosas fuentes de alimento y de amplios sitios de resguardo y reproducción, así como al escaso número de depredadores (18,19).

La circulación de *Leptospira* spp. se ha evidenciado en humanos (20-22) y en animales de Yucatán (8,9,21,23), lo cual indica la importancia de esta bacteria en la región. De igual forma, Torres-Castro, *et al.* (5, 6), y Vado-Solís, *et al.* (21), demostraron la infección en *M*. *musculus* y *R*. *rattus* con especies y serovares patógenos de *Leptospira* spp. mediante pruebas moleculares, histopatológicas y serológicas. No obstante, Reyes-Novelo, *et al*. (24), han señalado la necesidad de incrementar el número de investigaciones en poblaciones de animales silvestres que pudieran estar involucrados en el ciclo infeccioso de la leptospirosis en el sureste de México.

El presente es el primer estudio realizado en siete especies de roedores silvestres y sinantrópicos de Yucatán. Actualmente, se reconoce que la fauna silvestre, particularmente los pequeños mamíferos, pueden considerarse reservorios de *Leptospira* spp. de origen silvestre, constituir una fuente de mantenimiento y potencial foco de infección interespecífica, asegurando la circulación de ciertos serovares entre las mismas especies de animales, y ser huéspedes sensibles a la infección cuando entran en contacto por primera vez con serovares de circulación doméstica con los cuales no habían tenido contacto en su ambiente silvestre natural. Asimismo, se ha descrito que los animales silvestres pueden convertirse en huéspedes de mantenimiento, dependiendo de elementos como el serovar infeccioso y los factores ambientales (25,26), y representar un riesgo potencial para la diseminación de la enfermedad en las poblaciones humanas (2).

Heteromys gaumeri es un roedor endémico de la península de Yucatán, y ya se ha identificado en estudios en ambientes periurbanos y urbanos de la región (18,27). Espinosa-Martínez, *et al*. (28), demostraron la circulación de *L*. *interrogans* en

un individuo capturado en la reserva ecológica de Calakmul, Campeche, México, hallazgo similar al reportado en la presente investigación. Ambos hallazgos aportan nueva evidencia sobre la probable participación de este roedor en el ciclo infeccioso de la leptospirosis; además, los presentes resultados los sitúan como nuevos reservorios de *Leptospira* spp. en Yucatán. En un estudio previo, Panti-May, *et al.* (27), reportaron individuos de *H. gaumeri* positivos para *Rickettsia felis*, otro patógeno zoonótico endémico en la región (29).

En numerosos estudios moleculares alrededor del mundo, se ha documentado la circulación de *Leptospira* spp. en roedores sinantrópicos, principalmente *R. rattus* y *M. musculus*, lo cual los convierte en los reservorios más relevantes de dicha bacteria (30). En algunos de estos estudios se han registrado frecuencias de infección superiores a la reportada en el presente trabajo; por ejemplo, Guernier, *et al.* (31), evidenciaron prevalencias de 38,5 y 9 % para *R. rattus* y *M. musculus*, respectivamente, en la Isla Reunión. Asimismo, Halliday, *et al.* (32), encontraron 20 % de infección en ejemplares de *M. musculus* y 9 % en los de *R. rattus* capturados en un asentamiento urbano de Nairobi, Kenia.

En otros estudios se presentan porcentajes similares al descrito en el presente, por ejemplo, Mayer-Scholl, *et al.* (33), encontraron 6 % en individuos *M. musculus* capturados en 11 regiones de Alemania. En Tanzania, Mgode, *et al.* (34), no reportaron individuos *R. rattus* o *M. musculus* positivos, aunque debe señalarse que trabajaron con un ejemplar de cada especie.

Por otra parte, los productos aislados en las tres especies de roedores positivos en el presente estudio correspondieron a la especie patógena *L. interrogans*, previamente identificada en estos mismos animales en Yucatán (5). Asimismo, Foronda, *et al.* (35), reportaron la circulación de *L. interrogans* en *M. musculus* y *R. rattus* capturados en las Islas Canarias, España, y Tucunduva de Faria, *et al.* (36), en individuos *Rattus* spp., capturados en Salvador, Brasil.

En el presente estudio se registró una mayor frecuencia de infección en los roedores capturados en el ambiente urbano en comparación con los obtenidos en el medio silvestre, lo cual sugeriría que las leptospiras no se estarían propagando entre las poblaciones de roedores de ambos sitios de captura; sin embargo, se requieren nuevos estudios epidemiológicos para corroborar esta hipótesis.

Después de la confirmación de la presencia de *Leptospira* patógena en tejido renal de roedores sinantrópicos y silvestres de Yucatán, es necesario hacer muestreos más extensos y numerosos que ayuden a identificar otras especies, así como los serovares de *Leptospira* circulantes que eventualmente puedan infectar a animales y humanos de la región, pues la presencia de fauna silvestre o doméstica en las viviendas se ha asociado con la presentación de casos de leptospirosis humana de curso moderado a grave (37,38).

Asimismo, deben hacerse capturas en diferentes estaciones y temporadas (de lluvia y secas), ya que el factor ambiental también puede influir en los porcentajes de positividad encontrados en las diferentes especies (2,37), pues el contacto con fuentes de agua contaminada es un elemento fundamental para la transmisión de *Leptospira* spp. (39-42). Además, un estudio de casos y controles ayudaría a determinar el riesgo real asociado con la incidencia de leptospirosis en la población humana del sitio de estudio (43).

Resulta necesario aclarar las limitaciones del presente trabajo: aunque fue posible determinar que los roedores capturados eran portadores de *Leptospira* spp., y habían excretado bacterias viables, la técnica utilizada no permitió identificar los serovares involucrados en la infección, por lo que es necesario utilizar otras herramientas diagnósticas de identificación, como la microaglutinación (MAT), que permitan, además, saber si las posibles serovares son atípicos para los roedores de Yucatán (44,45). La identificación de serovares de *Leptospira* spp. en ambientes endémicos permite un mejor conocimiento de la epidemiología de la enfermedad, así como la implementación de medidas de control durante posibles brotes (46).

En conclusión, los roedores capturados en el sitio de estudio (Yucatán, México) eran reservorios de *Leptospira* spp. y podrían ser parte del ciclo de infección de la leptospirosis en la región. Se presenta la primera evidencia molecular de la circulación de *Leptospira* spp. en *H. gaumeri* en Yucatán, México.

Agradecimientos

Expresamos nuestro sincero agradecimiento a las autoridades municipales y a las familias de Cenotillo, Yucatán, México, por permitirnos el ingreso a sus hogares para la captura de los roedores. Este trabajo fue realizado en parte por alumnos del proyecto “SAVIA” de la Secretaría de Investigación, Innovación y Educación Superior del Gobierno del Estado de Yucatán.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses para la publicación del presente manuscrito.

Financiación

La captura de roedores y la toma de muestras biológicas fueron financiadas por el proyecto *Vector Borne Zoonosis in Yucatán: A One Health Approach*, código FMVZ-2016-0007. El trabajo de laboratorio se financió con recursos internos del Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", UADY.

Referencias

1. **Ko AI, Goarant C, Picardeau M.** *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for emerging zoonotic pathogen. Nat Rev Microbiol. 2009;7:736-47. https://doi.org/10.1038/nrmicro2208
2. **Yalin W, Lingbing Z, Hongliang Y, Jianmin X, Xiangyan Z, Xiaokui G, *et al*.** High prevalence of pathogenic *Leptospira* in wild and domesticated animals in an endemic area of China. Asian Pac J Trop Med. 2011;4:841-5. https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60205-8
3. **Torres-Castro M, Hernández-Betancourt S, Agudelo-Flórez P, Arroyave-Sierra E, Zavala-Castro J, Puerto IF.** Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2016;54:620-5.
4. **Sánchez-Montes S, Espinosa-Martínez DV, Ríos-Muñoz CA, Berzunza-Cruz M, Becker I.** Leptospirosis in Mexico: Epidemiology and potential distribution of human cases. PLoS One. 2015;10:e0133720. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133720
5. **Torres-Castro MA, Gutiérrez-Ruiz E, Hernández-Betancourt S, Peláez-Sánchez R, Agudelo-Flórez P, Guillermo-Cordero L, *et al*.** First molecular evidence of *Leptospira* spp. in synanthropic rodents captured in Yucatán, México. Revue Méd Vét. 2014;165:213-8.
6. **Torres-Castro M, Guillermo-Cordero L, Hernández-Betancourt S, Gutiérrez-Ruiz E, Agudelo-Flórez P, Peláez-Sánchez R, *et al*.** First histopathological study in kidneys of rodents naturally infected whit *Leptospira* pathogenic species from Yucatán, México. Asian Pac J Trop Med. 2016;9:145-7. https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.01.018
7. **Ruiz-Piña HA, Puc-Franco MA, Flores-Abuxapqui J, Vado-Solis I, Cárdenas-Marrufo MF.** Isolation of *Salmonella enterica* and serologic reactivity to *Leptospira interrogans* in opossums (*Didelphis virginiana*) from Yucatán, México. Rev Inst Med trop Sao Paulo. 2002;44:235-7. https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000400011
8. **Cárdenas-Marrufo MF, Vado-Solís I, Pérez-Osorio CE, Segura-Correa JC.** Seropositivity to leptospirosis in domestic reservoirs and detection of *Leptospira* spp. from water sources, in farms of Yucatán, México. Trop Subtrop Agroecosyst. 2011;14:185-9.
9. **Jiménez-Coello M, Vado-Solís I, Cárdenas-Marrufo MF, Rodríguez-Buenfil JC, Ortega-Pacheco A.** Serological survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatán, México, using two different tests. Acta Trop. 2008;106:22-6. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.12.011
10. **Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México.** Estado de Yucatán. Fecha de consulta: 10 de enero de 2017. Disponible en: http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM31yucatan/municipios/31012a.html
11. **Sikes RS, Gannon WL, Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists.** Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. J Mammal. 2011;92:235-53. https://doi.org/10.1644/10-MAMM-F-355.1
12. **Norma Oficial Mexicana NOM.062-ZOO-1999.** Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación. México. Fecha de consulta: 10 de enero de 2017. Disponible en: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/bioterio.NOM-062.pdf
13. **Leary S, Underwood W, Lilly E, Anthony R, Cartner S, Corey S, *et al*.** AVMA guidelines for the euthanasia of animals. Schaumburg, Illinois: American Veterinary Medical Association; 2013. p. 18-41.
14. **Haake DA, Suchard MA, Kelley MM, Dundoo M, Alt DP, Zuerner RL.** Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. J Bacteriol. 2004;186:2818-28. https://doi.org/10.1128/JB.186.9.2818-2828.2004
15. **Shukla J.** 16S rRNA PCR for differentiation of pathogenic and non-pathogenic leptospira isolates. Indian J Med Microbiol. 2003;21:25-30.
16. **Backstedt BT, Buyuktanir O, Lindow J, Wunder EA Jr, Reis MG, Usmani-Brown S, *et al*.** Efficient detection of pathogenic leptospires using 16S ribosomal RNA. PLoS One. 2015;10:e0128913. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128913
17. **Torres-Castro M.** Estudio sobre roedores sinantrópicos como reservorios de patógenos zoonóticos en Yucatán. Rev Biomed. 2017;28:89-115.
18. **Panti-May A, Hernández-Betancourt S, Ruiz-Piña H, Medina-Peralta S.** Abundance and population parameters of commensal rodents present in rural households in Yucatán, México. Int Biodeter Biodegr. 2012;66:77-81. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.10.006
19. **Panti-May JA, Hernández-Betancourt SF, Torres-Castro MA, Machain-Williams C, Cigarroa-Toledo N, Sodá L, *et al*.** Population characteristics of human-commensal rodents present in households from Mérida, Yucatán, México. Manter (Linc). 2016. Fecha de consulta: 10 de enero de 2017. Disponible en: https://digitalcommons.unl.edu/parasitology-manterlab/
20. **Zavala-Velázquez JE, Vado-Solís IA, Rodríguez-Félix ME, Rodríguez-Angulo EM, Barrera-Pérez MA, Guzmán-Marín ES.** Leptospirosis anictérica en un brote epidémico de dengue en la península de Yucatán. Rev Biomed. 1998;9:78-83.
21. **Vado-Solís I, Cárdenas-Marrufo MF, Jiménez-Delgadillo B, Alzina-López A, Laviada-Molina H, Suárez-Solís V, *et al*.** Clinical-epidemiological study of leptospirosis in humans and reservoirs in Yucatán, México. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2002;44:335-40. https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000600008

22. **Zavala-Velázquez J, Cárdenas-Marrufo M, Vado-Solís I, Cetina-Cámara M, Cano-Tur J, Laviada-Molina H.** Hemorrhagic pulmonary leptospirosis: Three cases from the Yucatán peninsula, México. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41:404-8. https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000400016

23. **Ortega-Pacheco A, Colin-Flores RF, Gutiérrez-Blanco E, Jiménez-Coello M.** Frequency and type of renal lesions in dogs naturally infected with *Leptospira* species. Ann N Y Acad Sci. 2008;1149:270-274. https://doi.org/10.1196/annals.1428.088

24. **Reyes-Novelo E, Ruiz-Piña H, Escobedo-Ortegón J, Rodríguez-Vivas I, Bolio-González M, Polanco-Rodríguez Á, *et al*.** Situación actual y perspectivas para el estudio de las enfermedades zoonóticas emergentes y reemergentes y olvidadas de la península de Yucatán, México. Trop Subtrop Agroecosys. 2011;14:35-54.

25. **Lilenbaum W, Monteiro RV, Albuquerque CE, Ristow P, Fraguas S, Cardoso VS, *et al*.** Leptospiral antibodies in wild felines from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. Vet J. 2004;168:191-3. https://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00139-4

26. **Vieira AS, Narduche L, Martins G, Schabib-Péres IAHF, Zimmermann NP, Juliano RS, *et al*.** Detection of wild animals as carriers of *Leptospira* by PCR in the Panantal biome, Brazil. Acta Trop. 2016;163:87-9. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.08.001

27. **Panti-May JA, Torres-Castro M, Hernández-Betancourt S, Dzul-Rosado K, Zavala-Castro J, López-Ávila K, *et al*.** Detection of *Rickettsia felis* in wild mammals from three municipalities in Yucatán, México. Ecohealth. 2015;12:523-7. https://doi.org/10.1007/s10393-014-1003-2

28. **Espinosa-Martínez DV, Sánchez-Montes DS, León-Paniagua L, Ríos-Muñoz CA, Berzunza-Cruz M, Becker I.** New wildlife hosts of *Leptospira interrogans* in Campeche, México. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015;57:181-3. https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000200015

29. **Zavala-Castro J, Zavala-Velázquez J, Walker D, Pérez-Osorio J, Peniche-Lara G.** Severe human infection with *Rickettsia felis* associated with hepatitis in Yucatán, México. Int J Med Microbiol. 2009;299:529-33. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.03.002

30. **Desvars A, Naze F, Benneveau A, Cardinale E, Michault A.** Endemicity of leptospirosis in domestic and wild animal species from Reunion Island (Indian Ocean). Edemiol Infect. 2013;141:1154-65. https://doi.org/10.1017/S0950268812002075

31. **Guernier V, Lagadec E, Cordonin C, Le Minter G, Gomard Y, Pagès F, *et al*.** Human leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: Are rodents the (only) ones to blame? PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0004733. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004733

32. **Halliday JE, Knobel DL, Allan KJ, de C Bronsvoort BM, Handel I, Agwanda B, *et al*.** Urban leptospirosis in Africa: A cross-sectional survey of *Leptospira* infection in rodents in the Kibera urban settlement, Nairobi, Kenya. Am J Trop Med Hyg. 2013;89:1095-102. https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0415

33. **Mayer-Scholl A, Hammerl JA, Schmidt S, Ulrich RG, Pfeffer M, Woll D, *et al*.** *Leptospira* spp. in rodents and shrews in Germany. Int J Environ Res Public Health. 2014;11:7562-74. https://doi.org/10.3390/ijerph110807562

34. **Mgode GF, Mhamphil G, Katakweba A, Paemelaere E, Willekens N, Leirs H, *et al*.** PCR detection of *Leptospira* DNA in rodents and insectivores from Tanzania. Belg J Zool. 2005;135:17-9.

35. **Foronda P, Martín-Alonso A, Del Castillo-Figueruelo B, Feliu C, Gil H, Valladares B.** Pathogenic *Leptospira* spp. in wild rodents, Canary Islands, Spain. Emerg Infect Dis. 2011;17:1781-2. https://doi.org/10.3201/eid1709.101470

36. **De Faria MT, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJ, Hartskeerl RA, Pereira MM, *et al*.** Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from and urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. Acta Trop. 2008;108:1-5. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.07.005

37. **Yusti D, Arboleda M, Agudelo-Flórez P.** Factores de riesgo sociales y ambientales relacionados con casos de leptospirosis de manejo ambulatorio y hospitalario, Turbo, Colombia. Biomédica. 2013;33:117-29. https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.1457

38. **Shelotto F, Hernández E, González S, Del Monte A, Ifran S, Flores K, *et al*.** A ten-year follow-up of human leptospirosis in Uruguay: An unresolved health problem. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2012;54:69-75. https://doi.org/10.1590/S0036-46652012000200003

39. **Loan HK, van Cuong N, Takhampunya R, Kiet BT, Campbell J, Them LN, *et al*.** How important are rats as vectors of leptospirosis in the Mekong Delta of Vietnam? Vector Borne Zoonotic Dis. 2015;15:56-65. https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1613

40. **Scialfa E, Bolpe J, Bardón JC, Ridao G, Gentile J, Gallicchio O.** Isolation of *Leptospira interrogans* from suburban rats in Tandii, Buenos Aires, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2010;42:126-128. https://doi.org/10.1590/S0325-75412010000200012

41. **Verdasquera-Corcho D, Barroso-Corría J, Barreras-Suárez BA, Pérez-Rodríguez A, Pérez-Soler K, Obregón-Fuentes AM, *et al*.** Factores asociados a la morbilidad por leptospirosis humana. Ciudad de La Habana, 2005-2006. Rev Panam Infectol. 2010;12:8-16.

42. **Nájera S, Alvis N, Babilonia D, Álvarez L, Máttar S.** Leptospirosis ocupacional en una región del Caribe colombiano. Salud Públ Méx. 2005;47:240-4.

43. **Agudelo-Flórez P, Londoño AF, Quiroz VH, Ángel JC, Moreno N, Loaiza ET, *et al*.** Prevalence of *Leptospira* spp. in urban rodents from a groceries trade center of Medellín, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2009;81:906-10. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0195

44. **Treml F, Nepeřený J, Janová E, Banďouchová H, Pikula J.** Prevalence of antibodies against leptospires in small mammals in relation to age, sex and season. ActaVer Brno. 2012;81:1097-102. https://doi.org/10.2754/avb201281020097

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

46. **Romero-Vivas CM, Thiry D, Rodríguez V, Calderón A, Arrieta G, Máttar S, *et al*.** Molecular serovar characterization of *Leptospira* isolates from animals and water in Colombia. Biomédica. 2013;33:179-184. https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.731

Biomédica 2018;38:59-67
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3862

ORIGINAL ARTICLE

Current characteristics of tuberculosis and human immunodeficiency virus co-infection in a cohort of hospitalized patients in Medellín, Colombia

Lina Ruiz[1*], María Angélica Maya[1*], Zulma Vanessa Rueda[2], Lucelly López[2], Lázaro Agustín Vélez[1]

[1] Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[2] Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia
* Both authors contributed equally to this paper.

Introduction: Tuberculosis (TB) is an important cause of morbidity and mortality in HIV patients. It is unknown if the advent of molecular diagnostic methods and a greater availability of antiretroviral therapy (ART) in our country have changed some characteristics of the TB/HIV co-infection.
Objective: To describe the epidemiology, clinical features, diagnosis, resistance patterns, tuberculosis drug effects and mortality in co-infected patients.
Materials and methods: Retrospective study based on the review of medical records of hospitalized co-infected adults in a university hospital in Medellín, Colombia.
Results: A total of 178 patients was included in the study. TB and HIV diagnosis was simultaneous in 49.4%. In the moment of TB diagnosis, the median CD4 count was 61 cells/µL (27-145). Pulmonary tuberculosis (PTB) occurred in 28% of patients, extrapulmonary (EPTB) in 23%, and mixed TB in 48.9%. The main EPTB affectations were lymphatic (55.4%), gastrointestinal (35.9%), and of the central nervous system (18.7%). Ziehl-Neelsen stain was positive in 137 patients (77%), mycobacterium culture in 121 (68%), and TB-PCR, in 85 of those patients in whom the test was done. Rifampicin resistance was detected in six cases (4.9%). Transaminases (ALT) increased in half of the patients during TB treatment, but only 10% met liver-toxicity criteria. In-hospital mortality was 11.3%. The single risk factor associated with mortality was CD4 count <50/µL (RR=3.9; 95% CI: 1.36-11.37; p=0.01).
Conclusions: When it occurs as an opportunistic infection, TB usually leads to the diagnosis of advanced HIV disease. If used appropriately, TB diagnosis in these patients can be done by conventional methods. It is always necessary to monitor liver function during TB treatment and to rule out drug resistance.

Key words: Tuberculosis; HIV; acquired immunodeficiency syndrome; drug-related side effects and adverse reactions; drug resistance; molecular diagnostic techniques.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3862

Características actuales de la coinfección con tuberculosis y el virus de la inmunodeficiencia humana en pacientes hospitalizados en Medellín, Colombia

Introducción. La tuberculosis es una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes positivos para el HIV. Los métodos de diagnóstico molecular y una mayor disponibilidad del tratamiento antirretroviral en el país pueden haber cambiado las características de la infección concomitante.
Objetivo. Describir la epidemiología, las características clínicas, el diagnóstico, los patrones de resistencia, los efectos secundarios de los medicamentos antituberculosos y la mortalidad, en pacientes con las dos infecciones.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio retrospectivo basado en la revisión de historias clínicas de adultos hospitalizados en un hospital universitario de Medellín, Colombia.
Resultados. Se incluyeron 178 pacientes en el estudio. El diagnóstico de tuberculosis e infección por el HIV fue simultáneo en 49,9 %. En el momento del diagnóstico, la mediana de CD4 fue de 61 células/µL (rango de 27 a 145). La tuberculosis pulmonar ocurrió en 28 % de los pacientes, la extrapulmonar en 23% y la mixta en 48,9%. En la tuberculosis extrapulmonar, el compromiso fue principalmente linfático (55,4 %), gastrointestinal (35,9%) y del sistema nervioso central (18,7 %). La tinción de Ziehl-Neelsen fue positiva en 137 pacientes (77 %), en tanto que el cultivo para micobacterias lo fue en 121 (68 %). La reacción en cadena de la polimerasa para detectar la tuberculosis fue positiva en 85

Author's contributions:
Lina Ruiz and María Angélica Maya: data acquisition
Zulma Vanessa Rueda and Lucelly López: data analysis
All authors participated in the conception, design, data interpretation, review, drafting, and final approval of the manuscript.

de los pacientes a quienes se les hizo la prueba. Se detectó resistencia a la rifampicina en seis casos (4,9 %). Al iniciar el tratamiento antituberculoso, las transaminasas se elevaron en la mitad de los pacientes, pero solo 10 % cumplieron los criterios de hepatotoxicidad. La mortalidad hospitalaria fue de 11,3 %. El único factor de riesgo asociado con la mortalidad fue un conteo de CD4 menor de 50/µL (RR=3,9; $IC_{95\%}$ 1,36-11,37; p=0,01).

Conclusiones. Cuando la tuberculosis se presenta de manera oportunista, comúnmente lleva al diagnóstico de enfermedad avanzada por el HIV. Su diagnóstico en estos pacientes puede hacerse con los métodos convencionales. Es necesario vigilar la función hepática durante el tratamiento y excluir la resistencia a los medicamentos.

Palabras clave: tuberculosis; VIH; síndrome de inmunodeficiencia adquirida; efectos colaterales y reacciones adversas relacionados con medicamentos; resistencia a medicamentos; técnicas de diagnóstico molecular.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3862

Tuberculosis (TB) continues to be an important cause of morbidity and mortality in individuals that are positive for the human immunodeficiency virus (HIV). Worldwide, 11.2% of the 10.4 million new TB cases in 2015 occurred in HIV-infected individuals. HIV co-infection is an important risk factor for the acquisition and development of active TB (1). Tuberculosis was reported to cause 1.4 million of deaths in 2015, 0.4 million of them among HIV-positive patients. In 2015, 268,000 active TB cases were reported in the Americas, 12% were co-infections with HIV, and 19% of patients died due to the co-infection. In that same year, 15,000 active TB cases were reported in Colombia, of which 14% were co-infections with HIV, similar to the 16% reported in 1995 in our institution (Velásquez G, García H, Arboleda C, Castro J, Díaz S, Garcés MC, *et al*. Características de la enfermedad tuberculosa y cumplimiento con las normas de aislamiento en un hospital universitario entre 1995 y 1998. Resumen A3. II Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Infectio. 2000;4:17).

Many co-infected patients are diagnosed only when they reach a third-level center; therefore, the diagnosis is late and leads to prolonged hospitalizations. Exploring risk factors for late diagnosis in 191 co-infected patients, Rossato, *et al*. (2) found that extrapulmonary TB and smear-negative TB contributed significantly to this delay.

HIV coinfection increases the risk of tuberculosis drug-induced liver injury (DILI) (3), complicating management and frequently forcing the discontinuation of first-line therapy and the use of alternative medications. On the other hand, TB/HIV co-infection also increases the risk of drug-resistant tuberculosis (4). These diagnostic and management challenges, adverse effects, and drug interactions all contribute to increase hospitalization rates and duration, as well as the cost of the therapy, with associated worse outcomes.

Recently, the advent of new molecular diagnostic tests for TB and a greater availability of antiretroviral therapy (ART) in Colombia may have changed the characteristics of TB/HIV co-infection in our patients. This study aimed to evaluate the current features of the co-infection, tuberculosis drug effects starting therapy, the impact of TB resistance and mortality in a cohort of TB/HIV co-infected patients hospitalized in a high-complexity hospital in Medellín, Colombia.

Materials and methods

Study design and population

We conducted a retrospective clinical chart review of hospitalized patients with TB/HIV co-infection in the *Hospital Universitario San Vicente Fundación*, (HUSVF) (a reference healthcare center for these kind of patients) in Medellín, Colombia, between 2007 and 2015, and of registers from Antioquia's health information systems (*Dirección Seccional de Salud de Antioquia*, DSSA).

Inclusion criteria were age 15 years or older with a confirmed diagnosis of HIV and active TB infection, and complete access to the medical record of everyone. Patients were excluded in the absence of confirmed HIV or TB infection when charts were not available, or when any other mycobacteria different from *Mycobacterium tuberculosis* grew in the culture. All patients were under the medical care of the infectious diseases section of the Hospital.

Corresponding author:
Lázaro Agustín Vélez, Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Calle 62 N° 52-59, torre 1, laboratorio 630, Medellín, Colombia
Telephone: (574) 219 6541
clamona@une.net.co

Received: 03/04/17; accepted: 28/02/18

Data collection and definitions

We collected all the demographic and epidemiological variables, as well as clinical, laboratory and treatment information regarding the co-infection. The confirmation of HIV infection required a positive Western blot or HIV viral load. In patients with a compatible clinical picture and no alternative diagnosis to explain it, TB was defined by the positivity of at least one of the following: i) Ziehl-Neelsen (ZN) stained smear; ii) *M. tuberculosis* culture; iii) ZN positive in compatible histopathology, and iv) *M. tuberculosis* molecular tests according to the diagnostic criteria of the World Health Organization (5). We used Ziehl-Neelsen stain for the entire duration of the study. Regarding the media for mycobacterial cultures, Ogawa was used between 2007 and 2012, Lowenstein from 2012 to 2015 and MGIT liquid culture as of 2015. Molecular tests have been performed since 2011 in the Hospital. Lymphocytes CD4+ count, HIV viral load, hepatitis B and C, and syphilis serology were obtained during the same hospitalization period in which co-infection was diagnosed.

Anemia was defined as a hemoglobin level of less than 13 g/dl in men and less than 12 g/dl in women; leukopenia as cell counts less than 4,000/µL, and thrombocytopenia as platelet count less than 100,000/µL. Clinical instability at admission was defined as a patient with at least three of the following vital signs out of normal range: Heart rate, 60-100/minute; spontaneous respiratory rate, 12-22/minute; systolic blood pressure, 90-120 mm Hg; temperature, 36.5-38.2°C, and pulse oximetry ≥90% without supplementary oxygen.

The TB clinical presentation was classified as pulmonary, extrapulmonary or mixed according to the compromised organs. TB treatment was categorized in two groups: i) First-line scheme [isoniazid (H), rifampicin (R), pyrazinamide (Z) and ethambutol (E)], and ii) a modified scheme when due to the clinical condition, adverse events, comorbidities, drug interactions or resistance to any TB medication, treatment included medications different from the first-line scheme.

Hepatotoxicity was defined as serum values of alanine aminotransferase (ALT) five times above the upper limit of normal (ULN) values in asymptomatic patients, or more than three times in patients with jaundice or gastrointestinal symptoms (6). Due to the retrospective character of the study, other clinical complications and adverse events associated with TB medications were only considered if they were verified by the specialist in infectious diseases in charge and documented in the clinical chart.

Poor adherence to treatment was defined as partial or total interruptions of treatment for more than a week prior to hospitalization, either by the patient's own decision or due to difficulties in accessing health services. Due to the nature of the chart review, we were not able to differentiate between them.

Positive cultures for mycobacteria were sent to Antioquia's laboratory of public health (*Laboratorio de Salud Pública*) for first-line drugs susceptibility testing. There, the susceptibility to rifampicin was confirmed by molecular methods and to all the first-line drugs by the proportions method. If MDR was found, these resistant strains were sent to the laboratory of the *Instituto Nacional de Salud* for evaluating the susceptibility to second-line drugs.

Statistical analysis

After we screened the database of all HIV patients for co-infection with TB, we did descriptive statistics of collected data. All variables were expressed as percentage or median and interquartile range (IQR). We evaluated risk factors associated with mortality using a binomial regression analysis adjusted by age. Covariates included in the analysis were previous ART, homelessness, previous TB, hepatitis B infection, main organs affected by TB, CD4 count cells <50/mm^3, HIV viral load ≥100,000, reactive VDRL, and hepatotoxicity. Results were expressed as adjusted relative risk with their 95% confidence interval. Data were analyzed in the statistic program SPSS™, version 22, and Stata™, version 12.0.

Ethics statement

The ethical committees of the Universidad de Antioquia and the HUSVF approved the study.

Results

We screened 221 hospitalized patients with suspected TB/HIV co-infection within the 2007-2015 period of whom 178 were included and 43 excluded. The main baseline features of these patients are shown in table 1.

TB and HIV diagnosis were confirmed simultaneously in 49.4% patients (86/174); of the remaining individuals with previous HIV diagnosis, only 38 had been on ART, the majority of them with poor adherence and advanced immunosuppression.

Table 1. Baseline characteristics of 178 hospitalized patients with TB/HIV co-infection in a university hospital in Medellín, Colombia

General characteristics	
Age, years, median (IQR)	38 (29-45)
Male sex, n (%)	137/178 (77)
HIV status	
Known HIV diagnosis at admission, n (%)	88/174 (50,6)
HIV viral load (copies/µl), median (IQR)	191,000 (42,300-750,000)
Lymphocytes T CD4+ count (cells/mL), median (IQR)	61 (27-145)
CD4 >200 cells/mL, n (%)	28/176 (16)
CD4 50-200 cells/mL, n (%)	74/176 (42)
CD4 <50 cells/mL, n (%)	74/176 (42)
Past medical history, n (%)	
Previous TB episode	37/176 (21)
Previous exposition to hepatitis B virus	47/141 (33.3)
Previous exposition to hepatitis C virus	4/152 (2.6)
Alcoholism	6/178 (3.4)
Chronic kidney disease	5/178 (2.8)
Epidemiological conditions, n (%)	
Homeless	26/177 (14.7)
Previous contact with a TB patient	13/123 (10.6)
Prisoners	6/176 (3.4)
Intravenous drugs users	4/175 (2.3)

Other co-infections diagnosed during hospitalization were toxoplasmosis in 10% of patients, histoplasmosis in 5.6%, cryptococcosis in 4.5%, and pneumocystosis in 3.4%. More than half (56.6%) of the patients had prior history of syphilis, 33% had been naturally exposed to wild hepatitis B virus (reactive AbHBc IgG), 8.9% were chronic carriers of AgsHB, and 19% had developed protective titers of AbHBs (>10 mIU/mL); 2.6% had evidence of previous exposition to hepatitis C (positive anti-HCV) (table 1).

At admission, 15% of patients had evidence of clinical instability, 86% anemia, 20% leucopenia, 23.5% thrombocytopenia, and 111 of 177 (63%) had liver function tests within normal range.

Clinical characteristics of TB in HIV-positive patients

Table 2 shows the clinical features at admission. Around 28% (50) of patients had pulmonary TB (PTB), 23% (41) extrapulmonary TB (EPTB) and 49% (87) disseminated disease. The organs and systems commonly affected in EPTB were lymphatic nodes (55.4%), peritoneum or gastrointestinal tract (35.9%), central nervous system (18.7%), and pleura (9.3%). Other TB presentations were genito-urinary (6 cases), bone marrow (6 cases), osteoarticular (3 cases), muscular (3 cases), pericardial (2 cases), laryngotracheal (1 case), ophthalmic (1 case), dorso-lumbar myelitis (1 case), mastoiditis (1 case), and cutaneous (1 case).

Microbiological diagnosis of TB

Table 3 shows the laboratory tool used for the diagnosis of TB. In general, Ziehl-Neelsen (ZN) stain was positive in 137 patients (77%), culture in 121 (68%), and *M. tuberculosis* PCR in 85 of the patients in whom this test was done. However, PCR supported the TB diagnosis in 25 patients with negative ZN. In 29 (16.3%) of the 178 patients the diagnosis was made only with ZN, and three of them died during the follow-up. In the two cases with negative ZN, culture and PCR, TB diagnosis was based on histopathology with positive ZN in tissues, clinical picture compatible with TB, and absence of an alternative diagnosis.

Drug-susceptibility testing

Among all first-line antibiotics tested, resistance to rifampicin was detected in six of 123 cases with available information (4.9%): Four had multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), one had pre-extensively drug resistance (pre-XDR), resistance to INH, SM, RMP, and EMB (HRSE), ethionamide and levofloxacin, and no susceptibility test to pyrazinamide available (this patient had prior history of treated gastrointestinal TB and drug

Table 2. Clinical characteristics of TB in 178 HIV-positive patients

Characteristics	n (%)
Symptoms	
Fever	154/178 (86.5)
Cough	136/178 (76.4)
Weight loss	132/178 (74.2)
Diarrhea	99/178 (55.6)
Night sweats	87/178 (48.9)
Dyspnea	63/178 (35.4)
Headache	62/178 (34.8)
Stomachache	57/178 (32)
Altered mental status	26/177 (14.7)
Chest pain	23/178 (12.9)
Signs	
Lymphadenopathy	105/177 (59.3)
Hepatomegaly	43/178 (24.2)
Splenomegaly	26/178 (14.6)
Ascites	6/178 (3.4)
Abdominal mass	4/177 (2.3)
TB presentation	
Pulmonary, exclusively	50/178 (28.1)
Extrapulmonary, exclusively	41/178 (23.0)
Mixed presentation	87/178 (48.9)
Radiographic patterns	
Hilar or paratracheal lymphadenopathies	68/173 (39.3)
Miliary pattern	40/172 (23.3)
Cavitations	20/173 (11.6)
Other findings compatibles with TB*	111/173 (64.2)

*Anyone with the following radiological findings: Pleural effusion, budding tree pattern, consolidation, or interstitial opacities

Table 3. Percentage of HIV/TB co-infected patients whose microbiological TB diagnosis was obtained by one or more diagnostic methods

Microbiological method	n	%
ZN+, culture+, PCR+	45	25,3
ZN+, culture+, PCR-	48	27,0
ZN+, culture-, PCR+	15	8,4
ZN+, culture-, PCR-	29	16,3
ZN-, culture+, PCR-	14	7,9
ZN-, culture-, PCR+	11	6,2
ZN-, culture+, PCR+	12	6,7
Culture +, PCR+ (*)	2	1,1
ZN-, culture-, PCR- (**)	2	1,1

ZN: Ziehl-Neelsen stain; culture: *Mycobacterium* culture; PCR: Polymerase chain reaction
* No ZN available for two patients
** In two of the patients, diagnosis was made by compatible histopathology with positive ZN in tissues

addiction disorder). The sixth case had resistance to rifampicin by a genotyping test (Gene Xpert™ MTB/RIF), but no susceptibility testing to other anti-tuberculous drugs was done.

Adverse events associated with anti-TB drugs

TB therapy was started in the hospital in 169 patients, 159 with the first-line scheme (HRZE), three with HZE plus moxifloxacin, one with RZE plus moxifloxacin, one with HRZ plus levofloxacin, two with HZE plus rifabutin, and three with second-line medications. Five did not receive in-hospital TB therapy because acid-fast stains had been negative and they were discharged before culture results were available, two died before the treatment could be initiated, and for two of the patients we had no available information.

An ALT increase was the most frequent adverse event associated with anti-TB therapy. ALT was measured in 177 patients and more than once in 152 (median=4.0, IQR: 2.0-6.0). Before starting TB treatment, the median of ALT was 26 U/L (IQR: 18-48). ALT was followed up for 18 days (IQR: 12-29) and 12 days was the time to get the maximal ALT value (IQR: 8-17). Among the 152 patients with more than one value available, 98 started TB treatment with normal ALT (64%), and 76 (50%) had an increase during the treatment; in eight the ULN increased between 3 and 5 times, in seven, more than 5 times, while none of the other 54 patients (36%) who started with an ALT level higher than the ULN increased more than twice the basal value.

Of the 159 patients who started on HRZE, 134 (84%) continued on the same medications at discharge, but 25 (16%) were switched to a modified scheme. Hepatotoxicity, according to the established definition, was present in 15 cases (10%); three of them restarted the same medications once normal values were reached, and 12 begun a modified treatment. In addition to liver toxicity, in 13 patients there were other reasons to change TB treatment: Nine cases due to drug interactions, two cases because of in-hospital detection of drug-resistant TB, and one case because of bone marrow toxicity and another discontinuation attributed to arthralgias. Other reported side effects that did not require interruption or changes on anti-TB treatment were bone marrow toxicity in 6%, skin allergy in 3%, and neurotoxicity and nephrotoxicity in three and two cases, respectively. The immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) was detected in 4% of the patients.

Risk factors associated with mortality

The median hospital stay was 19 days (IQR: 13-28), and the in-hospital mortality was 11.3% (20 of 177). According to registers of the local health information systems, at the end of February of 2015, 61 of the patients included in this study had died (34.3%). By multivariate analysis, having a CD4 count below 50 cells/mL was the only risk factor associated with in-hospital mortality (RR=3.94, 95% CI 1.36-11.37) (table 4).

Discussion

Our results highlight the fact that TB, a common opportunistic infection, led to the diagnosis of advanced HIV disease in about half of co-infected patients included in the study. Most of them were very immunocompromised and presented with disseminated and extrapulmonary disease, and almost 5% were resistant to rifampicin (generally associated with other resistances). During hospital stay, 16% had to interrupt or modify the TB first-line drugs (10% by hepatotoxicity), and CD4 cells<50/µL at admission was the single factor associated with in-hospital mortality.

Despite of the knowledge amassed about HIV infection, the progress in ART and a better access of patients to it worldwide, as well as the availability of rapid diagnostic and drug-susceptibility tests for TB in the last years, our results show that even in countries with moderate TB incidence like Colombia, TB is still frequently diagnosed among patients with advanced HIV-associated immunosuppression (Velásquez G, Mejía P, Restrepo N, Betancour J. Comportamiento de la tuberculosis en paciente infectados por el virus de la inmunodeficiencia

Table 4. Risk factors associated with in-hospital mortality among co-infected HIV-TB patients (bivariate and multivariate analysis)

Variable	Crude RR (95% CI)	p value	Adjusted RR (95% CI)	p value
Prior antiretroviral therapy	0.80 (0.33-1.90)	0.61		
Homeless	1.02 (0.32-3.23)	0.98		
Prior TB	0.43 (0.10-1.76)	0.24	0.56 (0.15-2.01)	0.37
Hepatitis B infection	0.82 (0.21-3.13)	0.78	0.86 (0.22-3.38)	0.82
Pulmonary TB	1.66 (0.51-5.36)	0.40		
Gastrointestinal TB	2.03 (0.86-4.81)	0.11	1.54 (0.70-3.38)	0.28
Meningeal TB	2.07 (0.76-5.62)	0.16		
TB lymphadenitis	0.28 (0.08-0.91)	0.03	0.40 (0.12-1.36)	0.14
CD4 count <50/mL	5.17 (1.79-14.94)	0.00	3.94 (1.36-11.37)	0.01
Viral load ≥100,000	0.80 (0.35-1.83)	0.60		
VDRL	1.58 (0.68-3.70)	0.29		
Hepatotoxicity	1.01 (0.36-2.83)	0.99		

Model adjusted by age

humana. Resúmenes del Segundo Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Medellín, Sociedad Colombiana de Infectología, 2000:4(1) Abs. E3:32.) (7-14).

Some possible reasons include late access to health systems (our hospital serves a community with low resources and poor access to health services) and structural delays in access to diagnosis and care. Barriers for antiretroviral therapy initiation are present despite global access to free antiretrovirals, which partially explains the fact that only 38 of the previously diagnosed individuals were on ART. The lack of early access to ART, even in the face of opportunistic infection, leads to repeated admissions, high costs, and poor outcomes. Individual characteristics such as alcohol and drug addiction, poor awareness of risk behaviors, misinformation regarding HIV disease (both among doctors and patients), and the fear of HIV test contribute as well to this situation. The fact that more than half of our patients are young adults previously exposed to other sexually transmitted diseases as syphilis and hepatitis B suggests poor knowledge about preventive measures and no awareness about risk behaviors, as well as limited access to HIV testing, which is a very important issue in our city.

Methods to diagnose TB are imperfect, therefore, many studies have shown that the association of fever, cough and weight loss should prompt diagnostic investigations in search for TB among HIV infected patients (15,16). In our study, confirmation of TB required the simultaneous use of multiple ZN stained smears and mycobacterial cultures, not only in pulmonary samples but also in many extrapulmonary specimens. In that sense, the study draws attention to the good diagnostic yield of the conventional methods such as ZN stain in all kind of samples (70% in respiratory samples and 51% in other samples), which could be explained by the multiple studies conducted in all affected organs (17-19).

On the other hand, the systematic study of all bronchoalveolar lavage (BAL) samples with very well trained staff increases the diagnostic yield of pulmonary TB in HIV patients (17). Our findings are in keeping with previously published reports suggesting that traditional microbiologic tests are still effective to diagnose the TB/HIV co-infection (20-22), which highlights the importance of sample quality and their systematic study.

The rate of rifampicin resistance in our co-infected patients was more than three times the 1,5% observed in the general population (23), similar to the 5% estimated globally for MDRTB (24), but different to the 19% reported in Eastern Europe, 7% in the Western Pacific region (25), and up to 18-26% of newly diagnosed TB cases in some countries (26). According to these findings, testing for TB drugs susceptibility, especially with molecular methods for first- and second-line ones, are mandatory for the timely management of all co-infected patients.

Resistance to rifampicin is usually associated with resistance to isoniazid and other drugs. However, monoresistance to rifampicin has been described in HIV-co-infected patients when they have been treated with intermittent rifampicin therapy and their CD4+ count is less than 100 cells/µL (27). It does not seem to be the problem in our patients, whose greatest risk of resistance is the poor adherence to the TB therapy (27-29); in fact, in the single patient whose resistance to rifampicin was confirmed only by Gene Xpert MTB, it was not possible to exclude resistance to other antibiotics.

Even though 50% of our patients experienced increases in ALT values after beginning the first-line TB treatment, only 9.4% (15 out of 159) had to interrupt it because of liver toxicity; however, contrary to expectations, in our study high basal ALT values did not predict hepatotoxicity due to TB therapy and, therefore, it did not lead to changes in the treatment. This prevalence is similar to the rates reported in India by Saha, *et al*. (30), who identified co-infection with hepatitis B or hepatitis C as risk factors for liver toxicity. We measured ALT values before starting TB treatment and could follow them closely until patients were discharged. In this study, neither co-infection with hepatitis B or C were associated with hepatotoxicity due to TB drugs. As biomarkers to predict liver toxicity have not been developed yet, the findings highlight the importance of closely monitoring the ALT levels in all TB/HIV patients, and not only in those with chronic hepatic diseases.

As demonstrated in other studies, we found that CD4 counts below 50 cells/µL were associated with in-hospital mortality (31). Again, this underpins the need to address the factors underlying late access to therapy. This subgroup of patients should be closely monitored, and considering their high mortality risk and the non-significant relevance of the immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) in most of them (only described in 4% of our patients), it is imperative to initiate the ART as soon as possible, usually two weeks after starting the TB treatment (32,33).

The main limitations of our study are related to its retrospective nature, and to the lack of a systematic database of co-infected patients in the city, which made it difficult to obtain results regarding the final outcome of TB treatment, patient survival or availability of antiretroviral drugs in the outpatient program. The date of death was not available either, so survival time could not be estimated. Bearing in mind that this study was conducted in a tertiary-care hospital, it would be necessary to conduct additional studies in centers with different levels of complexity to better characterize the co-infection in our population and, of course, to identify the main challenges for their diagnosis and treatment. Given that approximately half of the patients was previously diagnosed with HIV and, yet, they advanced to severe immunosuppression, studying this group and identifying missed opportunities for linkage to care and antiretroviral therapy initiation is a public health imperative.

In conclusion, our study shows that even after 35 years of HIV pandemic, TB is still a leading cause of advanced HIV diagnosis in our patients. The co-infections affected young adults not aware of risky sexual behaviors who had limited access to HIV testing and presented with both extrapulmonary and pulmonary TB. As their resistance to rifampicin and/or MDRTB is around three times higher than in the general population, and patients frequently have to stop TB drugs because of liver toxicity (about 10%), which cannot be predicted by available biomarkers, it is always necessary to monitor liver function closely during TB therapy and rule out drug resistance.

Acknowledgements

To the medical students who participated in the data collection, Sebastián Osorio, Natalia Vélez and Jazmín Serna, and the data analyst Diego Bastidas, for his collaboration in the analysis. To Dr. Yoav Keynan for his critical review of the paper, the input and the English proofreading.

Conflict of interests

The authors declared no conflict of interests.

Financing

The present study received fianancial support from the *Comité para el Desarrollo de la Investigación* (CODI), Universidad de Antioquia.

References

1. **World Health Organization Press.** Global Tuberculosis Report 2016. Accessed: December 10, 2016. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf?ua=1
2. **Yimer G, Gry M, Amogne W, Makonnen E, Habtewold A, Petros Z, *et al.*** Evaluation of patterns of liver toxicity in patients on antireroviral and anti-tuberculosis drugs: A prospective four arm observational study in Ethiopian patients. PLoS One. 2014:9:e94271. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094271
3. **Rossato D, Manica A, Tarso P.** Factors associated with delayed diagnosis of tuberculosis in hospitalized patients in a high TB and HIV burden setting: A cross-sectional. BMC Infect Dis. 2012;12:57. https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-57
4. **Villegas L, Otero L, Sterling TR, Huaman MA, van der Stuyft P, Gotuzzo E, *et al.*** Prevalence, risk factors, and treatment outcomes of isoniazid- and rifampicin-mono-resistant pulmonary tuberculosis in Lima, Perú. PLoS One. 2016;11:e0152933. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152933
5. **World Health Organization.** Definitions and reporting framework for tuberculosis – 2013 revision (updated December 2014). Geneva: WHO; 2013. p. 3.

6. **Saukkonen JJ, Cohn DL, Jasmer RM, Schenker S, Jereb JA, Nolan CM, *et al.*** An official ATS statement: Hepatotoxicity of antituberculosis therapy. Am J Respir Crit Care Med. 2006;174:935-52. https://doi.org/10.1164/rccm.200510-1666ST

7. **Rueda ZV, López L, Vélez LA, Marín D, Giraldo MR, Pulido H, *et al.*** High incidence of tuberculosis, low sensitivity of current diagnostic scheme and prolonged culture positivity in four Colombian prisons. A cohort study. PLoS One. 2013;8:e80592. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080592

8. **Hernández-Sarmiento JM, Dávila-Osorio VL, Martínez-Sánchez LM, Restrepo-Serna L, Grajales-Ospina DC, Toro-Montoya AE, *et al.*** Tuberculosis in indigenous communities of Antioquia, Colombia: Epidemiology and beliefs. J Immigr Minor Health. 2013;15:10-6. https://doi.org/10.1007/s10903-012-9688-1

9. **Machado JE, Martínez JW.** Asociación tuberculosis y VIH en pacientes de Pereira, Colombia. Colombia Médica. 2005;36:239-43.

10. **García I, Merchán A, Chaparro P, López L.** Panorama de la coinfección tuberculosis/VIH en Bogotá, 2001. Biomédica. 2004;24(Supl.1):132-7. https://doi.org/10.7705/biomedica.v24iSupp1.1312

11. **Gavilanes J, Hernández I, Garzón J, Varela E, Bilbao O, Guerrero J, *et al.*** Prevalencia de la coinfección VIH/TB en pacientes tuberculosos diagnosticados en el municipio de Pasto. Rev Univ Salud. 2010;12:50-6.

12. **Arenas N, Ramírez N, González G, Rubertone S, García A, Gómez-Marín J, *et al.*** Estado de la coinfección tuberculosis/virus de la inmunodeficiencia humana en el municipio de Armenia (Colombia): experiencia de 10 años. Infectio. 2012;16:140-7. https://doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70003-6

13. **de Paz D, Potes L, Quiñónez E, Martínez LF, Cepeda M, Guarín N, *et al.*** Resistencia a fármacos antituberculosis en pacientes coinfectados con tuberculosis y virus de la inmunodeficiencia humana, en un hospital de referencia de 2007 a 2010 en Cali (Colombia). Infectio. 2012;16:161-5. https://doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70006-1

14. **Pañuela-Epalza M, Vásquez-Beltrán M, De La Rosa-Barraza K, Hernández-Tapia H, Collazos-Daza J, Yanes-Miranda Y.** Factores asociados a la coinfección VIH/SIDA-tuberculosis Barranquilla (Colombia), 2003-2004. Revista Científica Salud Uninorte. 2006;22:5-19.

15. **Cohen R, Muzaffar S, Capellan J, Azar H, Chinikamwala M.** The validity of classic symptoms and chest radiographic configuration in predicting pulmonary tuberculosis. Chest. 1996;109:420-3.

16. **Padmapriyadarsini C, Tripathy S, Sekar L, Bhavani PK, Gaikwad N, Annadurai S, *et al.*** Evaluation of a diagnostic algorithm for sputum smear-negative pulmonary tuberculosis in HIV-infected adults. J Acquir Immune Defic Syndr. 2013;63:331-8. https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31829341af

17. **Vélez L, Correa LT, Maya MA, Mejía P, Ortega J, Bedoya V, *et al.*** Diagnostic accuracy of bronchoalveolar lavage samples in immunosuppressed patients with suspected pneumonia: Analysis of a protocol. Respir Med. 2007;101:2160-7. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2007.05.017

18. **Johnson JL, Vjecha MJ, Okwera A, Hatanga E, Byekwaso F, Wolski K, *et al.*** Impact of human immunodeficiency virus type-1 infection on the initial bacteriologic and radiographic manifestations of pulmonary tuberculosis in Uganda. Makerere University-Case Western Reserve University Research Collaboration. Int J Tuberc Lung Dis. 1998;2:397-404.

19. **Getahun H, Harrington M, O'Brien R, Nunn P.** Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource-constrained settings: Informing urgent policy changes. Lancet. 2007;369:2042-9. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60284-0

20. **Kivihya-Ndugga L, van Cleeff M, Juma E, Kimwomi J, Githui W, Oskam L, *et al.*** Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus. J Clin Microbiol. 2004;42:1012-5. https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1012-1015.2004

21. **Tamhane A, Chheng P, Dobbs T, Mak S, Sar B, Kimerling ME.** Predictors of smear-negative pulmonary tuberculosis in HIV-infected patients, Battambang, Cambodia. Int J Tuberc Lung Dis. 2009;13:347-54.

22. **da Silva RM, Machado T, Bazzo ML.** Diagnosis of the pulmonary tuberculosis by polymerase chain reaction: A comparative study between HIV-positive and -negative individuals. Braz J Microbiol. 2012;43:261-5.

23. **Rojas MY, Polo CL.** Informe de actividades realizadas por la Red Nacional de Laboratorios para la vigilancia de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos antituberculosos en Colombia, 2013. Accessed: June 19, 2016. Available from: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Documentacin%20Micobacterias/INFORME%20DE%20LA%20VIGILANCIA%20DE%20LA%20RESISTENCIA%20DE%20MYCOBACTERIUM%20TUBERCULOSIS%20A%20LOS%20F%C3%81RMACOS%20ANTITUBERCULOSOS%202013.pdf

24. **Dheda K, Warren RM, Zumla A, Grobusch MP.** Extensively drug-resistant tuberculosis: Epidemiology and management challenges. Infect Dis Clin North Am. 2010;24:705-25. https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.05.001

25. **World Health Organization.** Anti-tuberculosis drug resistance in the world: Fourth Global report. Geneva: WHO; 2008. Accessed: June 19, 2016. Available from: http://www.who.int/tb/publications/2008/drs_report4_26feb08.pdf

26. **Luetkemeyer A.**Tuberculosis and HIV. HIV InSite Knowledge Base Chapter. Accessed: June 15, 2016. Available from: http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-05-01-06#S3X

27. **Li J, Munsiff SS, Driver CR, Sackoff J.** Relapse and acquired rifampin resistance in HIV-infected patients with tuberculosis treated with rifampin- or rifabutin-based regimens in New York City, 1997-2000. Clin Infect Dis. 2005;41:83-91. https://doi.org/10.1086/430377

28. **Ahmad S, Mokaddas E.** Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Respir Med. 2009;103:1777-90. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2009.07.010

29. **King L, Ahuja S.** TB and HIV co-infection: Current trends, diagnosis and treatment update. The PRN Notebook. October 2006. Accessed: June 15, 2016. Available from: http://www.prn.org/images/pdfs/660_king_liza_v11n2-1.pdf

30. **Saha A, Shanthi FX, Winston AB, Das S, Kumar A, Michael JS, *et al.*** Prevalence of hepatotoxicity from antituberculosis therapy: A five-year experience from South India. J Prim Care Community Health. 2016;7:171-4. https://doi.org/10.1177/2150131916642431

31. **Wejse C, Furtado A, Camara C, Luneborg-Nielsen M, Sodemann M, Gerstoft J, *et al.*** Impact of tuberculosis treatment on CD4 cell count, HIV RNA, and p24 antigen in patients with HIV and tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2013;17:e907-12. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.05.003

32. **Uthman OA, Okwundu C, Gbenga K, Volmink J, Dowdy D, Zumla A, *et al.*** Optimal timing of antiretroviral therapy initiation for hiv-infected adults with newly diagnosed pulmonary tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med. 2015;163:32-9. https://doi.org/10.7326/M14-2979

33. **Marcy O, Laureillard D, Madec Y, Chan S, Mayaud C, Borand L, *et al.*** Causes and determinants of mortality in HIV-infected adults with tuberculosis: An analysis from the CAMELIA ANRS 1295-CIPRA KH001 randomized trial. Clin Infect Dis. 2014;59:435-45. https://doi.org/10.1093/cid/ciu283.

Biomédica 2018;38:68-79
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3930

ARTÍCULO ORIGINAL

Infección concomitante por tuberculosis y el virus de la inmunodeficiencia humana: situación epidemiológica en el departamento del Meta, 2010-2015

Laura Plata-Casas[1], Óscar Gutiérrez-Lesmes[1], Óscar Herrán-Falla[2]

[1] Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia
[2] Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Introducción. Una tercera parte del incremento de los casos de tuberculosis se atribuye a la propagación del HIV.
Objetivo. Describir la infección concomitante de tuberculosis y HIV en el departamento del Meta durante el periodo de 2010 a 2015.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio observacional, descriptivo y retrospectivo. Se seleccionaron los 219 casos de análisis y se elaboraron dos nuevas bases de datos que fueron analizadas en tres fases: determinación de las características sociodemográficas y clínicas, construcción de indicadores por municipio (prevalencia y éxito terapéutico) y estratificación en situaciones epidemiológicas según la prevalencia (carga) de la enfermedad.
Resultados. El 60 % de los municipios se ajustó a la situación designada como 2. El tratamiento de las personas con infección concomitante de tuberculosis y HIV cuya condición de ingreso era nueva, tuvo 2,39 veces más probabilidades de ser exitoso que el de los previamente tratados, siendo esta asociación estadísticamente significativa (razón de posibilidades, RP=2,39; $IC_{95\%}$ 1,3-9,6; p=0,01).
Conclusión. La estratificación por situaciones epidemiológicas es útil para planificar actividades de prevención y control.

Palabras clave: tuberculosis; VIH; coinfección; *Mycobacterium tuberculosis*; tratamiento farmacológico; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3930

Tuberculosis and human immunodeficiency virus coinfection: Epidemiological situation in the department of Meta, 2010- 2015

Introduction. One third of the increase in tuberculosis cases is attributed to the spread of HIV.
Objective. To describe the Tb/HIV coinfection in the department of Meta from 2010 to 2015.
Materials and methods. We conducted an observational, descriptive and retrospective study. After selecting 219 cases for analysis, two new databases were constructed and analyzed in three phases: Identification of sociodemographic and clinical characteristics, indicators by municipality (prevalence and therapeutic success) and stratification in epidemiological scenarios according to the prevalence (burden) of the illness.
Results. Sixty percent of the municipalities corresponded to scenario 2. People with Tb/HIV coinfection who had not been treated previously, had 2.39 times more probability of having therapeutic success compared to those previously treated, this association being statistically significant (RP=2,39; 95% CI 1,3-9,6; p=0,01).
Conclusion. Stratification by epidemiological scenarios is useful for planning prevention and control activities.

Key words: Tuberculosis; HIV; coinfection; *Mycobacterium tuberculosis*; drug therapy; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3930

Después del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), la tuberculosis es la segunda causa de muerte por una enfermedad infecciosa en las Américas (1), por lo que se considera un problema de salud pública. La tuberculosis es curable y afecta principalmente a poblaciones que presentan

Contribución de los autores:
Laura Plata-Casas: consolidación de la información, validación de los datos, análisis epidemiológico y discusión de los resultados
Óscar Gutiérrez-Lesmes: validación de la base de datos y análisis de los resultados
Óscar Herrán-Falla: análisis epidemiológico
Todos los autores participaron en el diseño del protocolo de investigación y en la escritura del manuscrito.

factores de riesgo, como la enfermedad pulmonar crónica, la diabetes mellitus, los trasplantes y los factores inmunosupresores, entre otros, los cuales incrementan en más del 20 % el riesgo de desarrollarla (1). Sin embargo, por su vinculación con la pobreza, la mala distribución del ingreso y la baja calidad de vida de la población, se ha convertido en un problema recurrente (2).

A nivel mundial, en el 2015, 10,4 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,8 millones murieron por esta causa, y más del 95 % de las muertes se produjo en los países de ingresos bajos y medios (3). Se estima que en el continente americano hubo, aproximadamente, 276.000 casos en el 2012, de los cuales el 67 % se presentó en Suramérica, principalmente en Brasil y Perú (43 %) (4). En el 2015, el sistema colombiano de vigilancia en salud pública (Sivigila) recibió la notificación de 12.918 casos de tuberculosis de todos los tipos, en tanto que la incidencia en el 2015 fue de 24,2 casos por 100.000 habitantes (5).

Uno de los factores de riesgo mencionados son las infecciones de transmisión sexual, como las causadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y su expresión tardía, el sida (6). En el 2009, se estimó que en el mundo había 33,3 millones de personas infectadas, de las cuales 1,4 millones eran de Centroamérica y Suramérica. En el período de 1983 al 31 de diciembre de 2015, en Colombia se reportaron 112.110 casos de infección por HIV y sida, y 12.764 muertes (7).

Desde la década de 1980, el HIV ha sido uno de los principales factores que han contribuido al resurgimiento de la tuberculosis en los países desarrollados y en desarrollo (8). La infección por el HIV y la inmunosupresión asociada son los factores de riesgo más importantes (9) para la tuberculosis activa, ya sea mediante la adquisición de una nueva infección o la reactivación de una ya existente, o tuberculosis latente (10). En situaciones en las que se disminuye la inmunidad celular, como es el caso de la infección por el HIV, la probabilidad de progresión a la enfermedad aumenta, lo que representa un desafío adicional para su control (11). Dado que la prevalencia por la infección con HIV supera el 5 % en uno o varios grupos clave, como los hombres que tienen relaciones sexuales con otros hombres, las personas que se inyectan drogas, la población carcelaria y los trabajadores sexuales, y que esta sigue presente en las mujeres gestantes, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la considera una epidemia concentrada (12).

Según la OMS, en el 2008 se reportaron 1,4 millones de personas con infección concomitante por tuberculosis y HIV. Del total de las muertes por sida, el 30 % se relacionó con la tuberculosis y el 6 % de las muertes por tuberculosis se asociaron con el HIV (13). En el 2014, se estimó que, de todos los casos incidentes de tuberculosis, 1,2 millones (12 %) correspondían a personas con HIV (5); además, se produjeron alrededor de 36.000 nuevos casos de infección concomitante por tuberculosis y HIV en la región de las Américas (14), lo cual representó el 13 % de los casos nuevos de tuberculosis; en el 2016, el 16,2 % de los casos de tuberculosis notificados en Colombia al Sivigila, correspondió a la infección simultánea con tuberculosis y HIV (15). La tasa de mortalidad relacionada con la tuberculosis para el mismo período fue de 1,8 por 100.000.

La OMS lanzó la estrategia de “Alto a la tuberculosis”, cuya meta era reducir su prevalencia y mortalidad. Al no haberse logrado del todo las metas propuestas, hoy los objetivos a nivel mundial se enmarcan en una nueva estrategia llamada “Fin de la tuberculosis”, con la cual se busca eliminar la enfermedad para el año 2050 (1). Entre las recomendaciones para el tratamiento de la tuberculosis concomitante con la infección por HIV, está la de ampliar a 156 dosis la fase de continuación del tratamiento, ajustándolas según la edad de los sujetos (16).

La estratificación por situaciones epidemiológicas forma parte del proceso integral de diagnóstico, intervención y evaluación, y del enfoque epidemiológico de riesgo, y resulta útil para obtener un diagnóstico objetivo que permita planificar las actividades de prevención y control y como base para categorizar metodológicamente e integrar las áreas geoecológicas y los grupos poblacionales según los factores de riesgo (17).

Hay un amplio conjunto de normas nacionales que establecen la afiliación al Sistema General de Seguridad Social en Salud (SGSSS) y la ejecución de actividades de prevención, vigilancia y control

Correspondencia:
Laura Plata-Casas, Calle 6B N° 37-05, Villavicencio, Colombia
Teléfono:(312) 448 8112
lplata@unillanos.edu.co

Recibido: 05/07/17; aceptado: 28/02/18

de la tuberculosis de manera descentralizada (18-22). Asimismo, en los programas a nivel departamental, municipal e institucional, se establecen las directrices nacionales del Ministerio de Salud contenidas en el programa nacional de control de la tuberculosis.

El Plan Decenal de Salud Pública, 2012-2021, en su capítulo sobre vida saludable y enfermedades transmisibles, contempla para el 2021 la reducción progresiva de la mortalidad por tuberculosis a menos de 1,59 casos por 100.000 habitantes en todo el territorio colombiano (23). La nueva política de la agenda posterior al 2015 establece que en el 2017 el 95 % de las entidades territoriales debe incluir en sus planes operativos anuales la prevalencia del HIV entre personas con tuberculosis como punto de partida para el diseño y la inclusión de actividades colaborativas contra la infección concomitante (1).

El departamento del Meta se encuentra localizado en la región centro-oriental del país; está dividido en 29 municipios y tiene cerca de un millón de habitantes, 50 % de los cuales viven en Villavicencio, su capital; diez de sus municipios tienen población indígena, la cual representa alrededor del 1,2 % de la población departamental. En su territorio se dan fenómenos migratorios internos y externos importantes, en tanto que su economía legal es diversificada y se basa principalmente en la agricultura, la ganadería, el petróleo, el comercio y la industria.

El objetivo de este estudio fue describir la situación epidemiológica de la infección concomitante de tuberculosis y HIV en el departamento del Meta en el período de 2010 a 2015, así como estratificar sus municipios por situaciones epidemiológicas según la prevalencia y el éxito del tratamiento, y establecer la relación entre dicho éxito y algunas variables sociodemográficas.

Materiales y métodos

El estudio se realizó en tres fases: a) identificación de las características sociodemográficas y clínicas de los sujetos con las infecciones concomitantes; b) construcción de los indicadores por municipio (prevalencia y éxito del tratamiento), y c) estratificación por situaciones epidemiológicas según la prevalencia y el éxito del tratamiento. El éxito del tratamiento se definió con base en lo contemplado en el plan estratégico “Colombia libre de tuberculosis” (24).

Tipo de estudio y población

Se hizo un estudio epidemiológico descriptivo con base en la información retrospectiva del departamento del Meta, correspondiente al periodo de 2010 a 2015.

Fuentes de información

Se tomó la información de las bases de datos en formato Excel de los programas departamentales de control de la tuberculosis y de HIV, las cuales son validadas trimestralmente por el Ministerio de Salud y Protección Social en cuanto a la calidad de los datos y la estructura. En estas se encontró el registro de 2.626 casos de tuberculosis reportados por los centros de salud, las clínicas y los hospitales de la red de instituciones prestadoras de salud del departamento. En estas bases se contemplan las variables definidas según los lineamientos de la circular 058 de 2009 del Ministerio de Protección Social (22).

Se utilizaron los siguientes criterios de inclusión: personas con presencia simultánea de tuberculosis e infección por HIV que tuvieran definida la condición de egreso en el programa. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: personas con tuberculosis y HIV que tuvieran definida la condición de egreso en el programa fallecidas antes de la realización de la serología para HIV, o población cuyo lugar de procedencia no fuera un municipio del Meta.

Con base en tales criterios, se seleccionaron 202 registros (120 correspondientes a personas con infección concomitante y 82 con diagnóstico previo de HIV). Los 2.428 registros de personas sin infección concomitante se cruzaron con la base de datos del programa de HIV en el mismo período de estudio, y se encontraron 21 registros con diagnóstico de HIV, los cuales se incorporaron a la base de análisis; los restantes 2.403 se eliminaron. La aplicación de los criterios de exclusión resultó en la eliminación de cuatro registros. En total, se seleccionaron 219 casos que se ajustaban a las características requeridas.

Se hizo un riguroso proceso de control de calidad para detectar errores de digitación y datos perdidos, y se construyeron dos nuevas bases de datos, una por cada unidad de análisis: una con las personas cuyas características sociodemográficas y clínicas se tuvieron en cuenta, y otra con los municipios en los cuales se construyeron los indicadores de prevalencia y éxito del tratamiento. En la figura 1 se presenta el resumen de las fases del

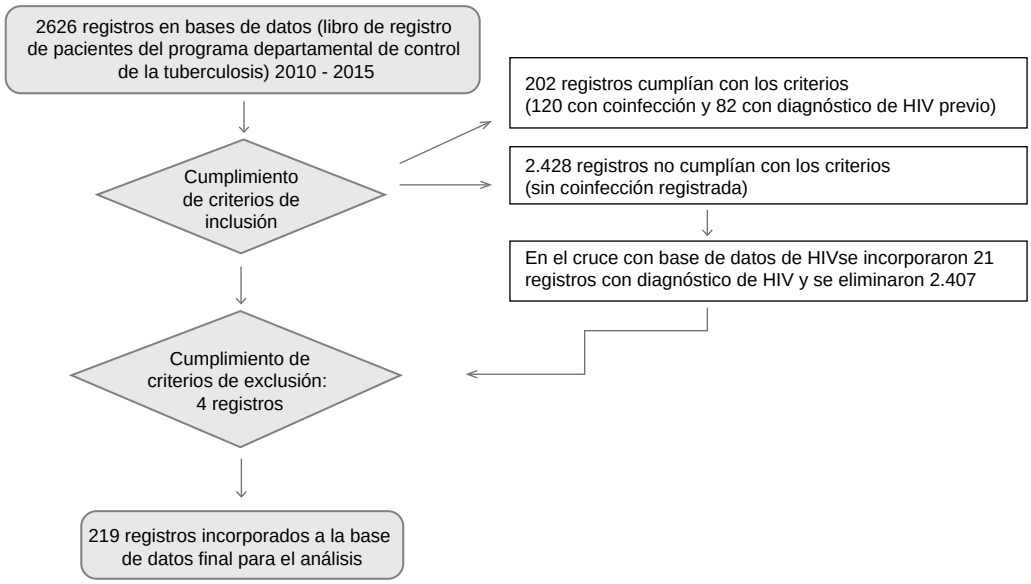

Figura 1. Flujograma de selección de registros para análisis

proceso de selección hasta llegar al total de registros para el análisis. No se requirió muestreo debido a que se tuvieron en cuenta todos los registros de la base de datos.

Variables estudiadas

La definición de caso de tuberculosis se estableció como el diagnóstico de la infección mediante baciloscopia, cultivo o prueba molecular positivos, o pruebas negativas pero con cumplimiento de los criterios clínicos y radiológicos, o prueba de tuberculina positiva, en personas con prescripción del tratamiento antituberculoso por parte del médico tratante (25). La definición de caso de HIV se determinó como aquel confirmado por laboratorio con el cumplimiento de los criterios de los algoritmos (6), en tanto que el caso de infección concomitante de tuberculosis y HIV se definió como aquel en el que se presentaran las dos enfermedades.

Para los casos de infección concomitante, se tuvieron en cuenta las variables sociodemográficas de edad, sexo, etnia, grupo poblacional y afiliación al SGSSS; además, las variables clínicas de la tuberculosis (pulmonar o extrapulmonar), la condición de ingreso según la historia de tratamiento previo de la tuberculosis y la condición en el momento del egreso.

El estado del paciente en el momento del egreso final se consideró como la medida directa más importante de eficacia del programa de control de la tuberculosis. En este sentido, quienes se incluyen en el registro de tratamiento deben ser asignados a una de seis categorías establecidas: curado, tratamiento terminado o completado, fallecido, fracaso, abandono y transferido, las cuales son mutuamente excluyentes. Esta variable se codificó de nuevo y se estableció la dicotomía contemplando el éxito del tratamiento, el cual correspondió a las categorías de “curado” y “tratamiento terminado o completado”.

Otra medida importante utilizada en el estudio fue la prevalencia de la enfermedad, denominada carga en el plan estratégico “Colombia libre de tuberculosis, 2010-2015, para la expansión y fortalecimiento de la estrategia ‘Alto a la tuberculosis’” (24).

Análisis estadístico

Fase uno. Identificación de las características sociodemográficas y clínicas de los sujetos con infección concomitante. Se describieron las variables mediante estadística descriptiva (las variables cualitativas se expresaron en frecuencias y porcentajes, y las cuantitativas, en medidas de tendencia central y variabilidad). Se utilizó el programa SPSS™, versión 23, con licencia de propiedad de la Universidad de los Llanos.

Fase dos. Construcción de los indicadores por municipio (prevalencia y éxito del tratamiento). Se construyó el indicador de prevalencia para cada municipio y para el período de estudio, usando como numerador el número de casos por municipio y, como denominador, la población municipal

para el período según reporte del Departamento Nacional de Estadística (DANE). Todas las tasas se calcularon usando una constante de 100.000 habitantes.

Para el cálculo de la prevalencia, se utilizó la siguiente fórmula:
Prevalencia = número de enfermos con tuberculosis y HIV en un periodo y lugar X 100.000 de la población sensible en el periodo y lugar

Una vez establecidas las prevalencias, se calculó la media para definir un valor de comparación a partir del cual se calculó el percentil 75 de estos datos y se definieron dos categorías: prevalencia alta (entidades municipales cuya media era igual o superior al percentil 75) y prevalencia baja (entidades municipales cuya media era inferior al percentil 75). La estratificación según alta o baja carga (tomada como prevalencia), se basó en lo contemplado en el plan estratégico "Colombia libre de tuberculosis, 2010-2015, para la expansión y fortalecimiento de la estrategia 'Alto a la tuberculosis'" (24), adoptado en Colombia por el entonces Ministerio de la Protección Social conforme a lo dispuesto en la Cumbre del Milenio y el documento Conpes Social Nº 91 de 2005, el cual fue incorporado al Plan Nacional de Salud Pública establecido mediante el Decreto 3039 de 2007 (26).

Fase tres. Estratificación en situaciones epidemiológicas según la prevalencia y el éxito del tratamiento. Se construyó el indicador de éxito del tratamiento y se agruparon las entidades municipales así: aquellas cuyo promedio fue de 85 % o más de éxito del tratamiento, y aquellas con un promedio menor de 85 %. En el campo de la lucha contra la tuberculosis, los objetivos de desarrollo del milenio establecieron la meta de curar, al menos, al 85 % de las personas afectadas (27).

Con base en la prevalencia de la enfermedad (alta o baja) y del éxito del tratamiento (mayor o menor de 85 %), se construyeron cuatro situaciones en las cuales se estratificaron los municipios.

Análisis bivariado

Se usaron razones de prevalencia crudas y ajustadas, y sus intervalos de confianza (IC) de 95 %, así como la prueba estadística de ji al cuadrado, con el propósito de establecer si la hipótesis de que el éxito del tratamiento (variable dependiente) en las personas con infección concomitante por tuberculosis y HIV tenía alguna asociación con las variables de sexo, edad, régimen de afiliación, tipo de tuberculosis y condición de ingreso, era válida. Algunas de estas personas fueron codificadas de nuevo.

Las razones de prevalencia y sus intervalos de confianza del 95 % se ajustaron en un modelo de regresión binomial considerando el éxito del tratamiento como variable dependiente y, las variables de régimen de afiliación, tipo de tuberculosis y condición de ingreso (en todos los grupos de edad y sexo), como factores predictores. No se usó la variable de situación epidemiológica porque sus categorías contaban con menos de cinco datos, lo que imposibilitaba el cálculo de la prueba estadística.

Consideraciones éticas

Este estudió contó con el aval ético del Comité de la Universidad de los Llanos y se ajustó a todos los requisitos exigidos por la Resolución 8430 de 1993 para la investigación en salud en Colombia (28). No representó riesgo real ni potencial para los sujetos, el método de recolección fue documental y no se hizo ninguna intervención o modificación intencionada en los participantes. No se usaron nombres ni números de documentos de identidad, con el fin de salvaguardar la confidencialidad.

Las estimaciones se hicieron únicamente para cuatro grandes situaciones epidemiológicas, con lo cual se evitaron los riesgos derivados de los resultados, tales como hechos de violencia, discriminación, rechazo y estigmatización o desplazamiento. Además, los autores se comprometieron con la política de protección del medio ambiente y, en especial, con el uso racional de recursos.

Resultados

Para facilitar su interpretación, los resultados se presentan según las fases desarrolladas.

Fase uno

Identificación de las características sociodemográficas y clínicas de los sujetos con infección concomitante. En cuanto a las características sociodemográficas, el 76,7 % de los afectados estudiados pertenecía al sexo masculino, su promedio de edad fue de 38 años (desviación estándar, DE=12,7) y 50 % de ellos tenía 34 años o menos (rango de 2 a 80 años). En cuanto a la raza, se encontraron indígenas (1,8 %) y negros o mulatos (0,9 %). Entre los grupos poblacionales había población carcelaria (2,7 %) y habitantes de calle (1,8 %). El 77 % estaba afiliado al SGSSS, 44 % de ellos bajo régimen subsidiado.

En 69,4 % de los casos, la tuberculosis era pulmonar y, en aquellos con tuberculosis extrapulmonar, los tipos más frecuentes fueron la meníngea (23,9 %), la miliar (17,9 %), la ganglionar (17,9 %) y la pleural (10,4 %).

En cuanto a los antecedentes de tratamiento de la tuberculosis, el 87,7 % de los casos eran nuevos; en el 36,5 %, había diagnóstico previo de HIV; en el 41 %, se registraba el éxito del tratamiento en el momento del egreso, y el 34,7 % de los pacientes murió durante el tratamiento.

Fase dos

Construcción de los indicadores por municipio (prevalencia y éxito del tratamiento). Los municipios en los que se concentraron los casos de infección simultánea de tuberculosis y HIV fueron Villavicencio (79,9 %), Acacías (6,4 %) y Granada (2,7 %); en los dos primeros, se presentaron casos durante todo el período de estudio. En 38,3 % de los municipios no se reportaron casos (cuadro 1).

El 2010 fue el año en el que más municipios (27,6 %) reportaron casos. La mayor prevalencia (36,3%) se presentó en el 2011 en el municipio de San Carlos de Guaroa. En Cumaral, Fuentedeoro, Mapiripán, Puerto Concordia, San Carlos de Guaroa y Vistahermosa, no se reportaron casos en los últimos tres años. Castilla, Cubarral, Puerto Gaitán y Restrepo no habían reportado casos anteriormente, pero sí en los dos últimos años. En el 34,5 % de los municipios hubo una alta prevalencia. En el 26,7 % de los 15 municipios que presentaron casos en el período de estudio, el tratamiento de la infección concomitante fue exitoso.

Fase tres

Estratificación en situaciones epidemiológicas según la prevalencia y el éxito del tratamiento. En cuanto a la estratificación por situaciones epidemiológicas, el 6,6 % de los municipios correspondió a la situación 1, el 60 %, a la 2, el 20 % a la 3, y el restante 13,3 % a la 4. El 48 % de los municipios no pudo ubicarse en ninguna de las situaciones toda vez que no reportaron casos ni tuvieron pacientes en tratamiento en el período de estudio (cuadro 2, figura 2). La tendencia de la tasa de éxito del tratamiento fue decreciente (figura 3).

Análisis bivariado

No se encontró una asociación positiva entre el éxito terapéutico y las variables de sexo, edad, afiliación al SGSSS y tipo de tuberculosis, pero sí con la condición de ingreso según el antecedente de tratamiento previo de la tuberculosis. Cabe destacar la significación clínica del hecho de que no hubo asociación con el tipo de tuberculosis y la significación social del hecho de no haberse encontrado asociación con el régimen de afiliación a la seguridad social.

La asociación con los casos de ingresos nuevos fue positiva (RP: 2,39; $IC_{95\%}$: 1,3-9,6), y se conservó al ajustar por edad y sexo (RP ajustada=3,1; $IC_{95\%}$ 1,6-14; p=0,01), lo que aporta, además, a la signi-ficación clínica e implica un reto para el programa en cuanto a contrarrestar las pérdidas durante el seguimiento (cuadro 3).

Discusión

El programa para el control de la tuberculosis en el departamento del Meta debe ajustarse a lo propuesto a nivel nacional, a las competencias establecidas en las normas (18,20,29) y a lo contemplado en el plan estratégico “Colombia libre de tuberculosis, 2010-2015” (16,24). En ese marco, debe fortalecerse la expansión de la estrategia “Alto a la tuberculosis” para reducir la incidencia y la mortalidad, garantizar el acceso a los servicios de detección temprana, de diagnóstico y de tratamiento, garantizar la capacidad operativa de los recursos técnicos, los insumos y los medicamentos, brindar un diagnóstico bacteriológico oportuno y de calidad, fortalecer las alianzas estratégicas, y trabajar con otros programas para enfrentar la amenaza de la infección concomitante de tuberculosis y HIV, entre otros.

Actualmente, se acepta que la tuberculosis y la pandemia de HIV son la primera causa de muerte en extensas zonas del mundo (8). Según el análisis de situación en salud de Colombia (30) y del Meta (31), las enfermedades transmisibles no son ya la primera causa de mortalidad, y la tendencia es a seguir decreciendo, pero en ambos sexos el HIV/sida y la tuberculosis persisten. Durante el 2016, la asociación entre tuberculosis y HIV en Colombia fue de 15,8 %, y el departamento del Meta aportó el 2,3 % (5). En cuanto a la mortalidad, la tasa nacional para la tuberculosis es de 2,45 casos por 100.000 habitantes y, la del Meta, de 5,4 por 100.000 habitantes.

Cabe resaltar que 21 de los casos de este estudio recibieron tratamiento para la tuberculosis más no para su presentación simultánea con el HIV. En este contexto, es importante prolongar el tratamiento a nueve meses para disminuir la posibilidad de recaídas (32,33). Este hallazgo muestra una debilidad del programa de control de

Cuadro 1. Clasificación de los municipios del departamento del Meta por carga de la enfermedad, éxito del tratamiento y situación epidemiológica

Municipio	Prevalencia en el período por 100.000 habitantes					Éxito del tratamiento	Situación
	Casos de infección concomitante n (%)	Rango de edad	Media de población (2012-2013)	Prevalencia en el periodo	Clasificación por prevalencia (alta o baja)		
Villavicencio	176 (80,4)	78	457.822	38,4	Alta	41	2
Acacías	14 (6,4)	45	65.044	21,5	Alta	53	2
Barranca de Upía	0 (0)		3.737	0,0	Sin reporte de casos	Sin casos	
Cabuyaro	0 (0)		3.929	0,0	Sin reporte de casos	Sin casos	
Castilla La Nueva	1 (0,5)	31	8.921	11,2	Alta	0	2
Cubarral	1 (0,5)	43	5.758	17,4	Alta	0	2
Cumaral	1 (0,5)	25	17.690	5,7	Baja	100	2
El Calvario	0 (0)		2.258	0,0	Sin reporte de casos	Sin casos	
El Castillo	0 (0)		6.498	0,0	Sin reporte de casos	Sin casos	
El Dorado	0 (0)		3.403	0,0	Sin reporte de casos	Sin casos	
Fuentedeoro	1 (0,5)	28	12.714	7,9	Baja	100	3
Granada	6 (2,7)	31	59.121	10,1	Alta	50	2
Guamal	0 (0)		9.262	0,0	Sin reporte de casos	Sin casos	
Mapiripán	1 (0,5)	43	16.184	6,2	Baja	100	3
Mesetas	0 (0)		11.128	0,0	Sin reporte de casos	Sin casos	
La Macarena	0 (0)		30.566	0,0	Sin reporte de casos	Sin casos	
Uribe	0 (0)		15.199	0,0	Sin reporte de casos	Sin casos	
Lejanías	0 (0)		9.467	0,0	Sin reporte de casos	Sin casos	
Puerto Concordia	2 (0,9)	46	19.572	10,2	Alta	100	1
Puerto Gaitán	3 (1,4)	27	18.266	16,4	Alta	25	2
Puerto López	2 (0,9)	37	32.330	6,2	Baja	50	4
Puerto Lleras	0 (0)		10.087	0,0	Sin reporte de casos	Sin casos	
Puerto Rico	0 (0)		18.364	0,0	Sin reporte de casos	Sin casos	
Restrepo	3 (1,4)	34	10.528	28,5	Alta	0	2
San Carlos de Guaroa	4 (1,8)	37	8.744	45,7	Alta	50	2
San Juan de Arama	0 (0)		8.930	0,0	Sin reporte de casos	Sin casos	
San Juanito	0 (0)		2.092	0,0	Sin reporte de casos	Sin casos	
San Martín	3 (1,4)	33	23.861	12,6	Alta	0	2
Vistahermosa	1 (0,5)	30	24.370	4,1	Baja	0	4

Cuadro 2. Estratificación de los municipios según la infección concomitante por tuberculosis y HIV, departamento del Meta, 2010-2015

Éxito del tratamiento	Carga de la enfermedad	
	Alta carga	Baja carga
≥85 %	Situación 1: Puerto Concordia	Situación 3: Cumaral, Fuentedeoro, Mapiripán
<85 %	Situación 2: Villavicencio, Acacías, Castilla, Cubarral, Granada, Puerto Gaitán, Restrepo, San Carlos de Guaroa, San Martín	Situación 4: Puerto López, Vistahermosa

Fuente: Ministerio de la Protección Social, plan estratégico “Colombia libre de tuberculosis, 2010-2015” para la expansión y fortalecimiento de la estrategia “Alto a la tuberculosis”, 2009

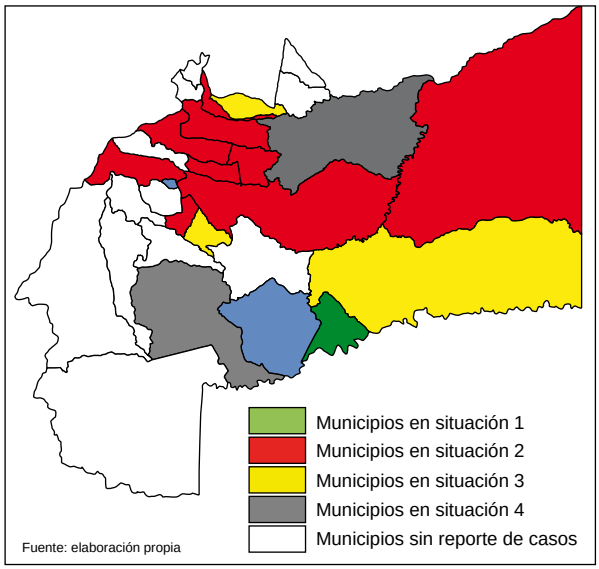

Figura 2. Mapa de georreferenciación con los situaciones epidemiológicas de la infección concomitante por tuberculosis y HIV, departamento del Meta, 2010-2015

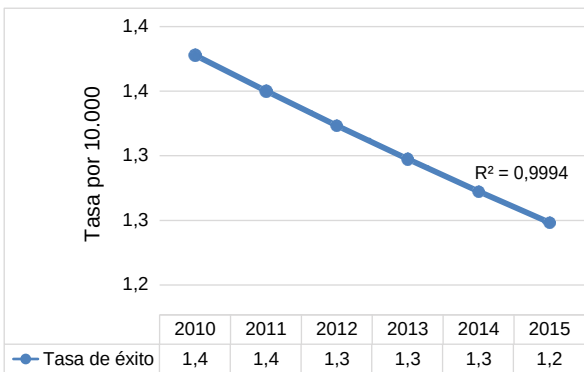

Figura 3. Tasa de éxito del tratamiento para la infección concomitante por tuberculosis y HIV, departamento del Meta, 2010-2015

la tuberculosis y de las actividades conjuntas con el de HIV. En este sentido, en algunos estudios y análisis de los programas de tuberculosis, se han dado recomendaciones para subsanar las fallas (34-36).

En el análisis de los datos por sexo (76,7 % en hombres) se encontró que estos concordaban con lo reportado en el Sivigila en el 2016 (63,6 %) (5). En otro estudio nacional se reportó un 58,7 % en hombres (37) y en algunos estudios internacionales tambien se informó de un mayor porcentaje en hombres (38-40). Algunos autores mencionan como causas de la mayor afectación del sexo masculino la presencia de factores de riesgo como el consumo de tabaco y de alcohol y la drogadicción, así como una vida social más activa, y, por lo tanto, mayor exposición (41,42) a las dos condiciones clínicas.

En cuanto a la edad, el 50 % de los casos correspondió a adultos jóvenes, lo cual concuerda con lo reportado en otros estudios (43,44), y puede estar relacionado con factores económicos, toda vez que este es el grupo más productivo (45).

La enfermedad en indígenas (1,8 %) puede deberse a una doble condición de vulnerabilidad: sociocultural e inmunológica, lo cual debe ser detectado oportunamente por los programas, con el fin de garantizar el acceso al tratamiento y contribuir así a la disminución de la transmisión de la enfermedad (46).

Los grupos afectados incluyeron la población carcelaria y de habitantes de calle. Se estima que el riesgo de enfermar de tuberculosis en las cárceles es cuatro a cinco veces mayor que en la población general (47) debido a las condiciones de hacinamiento. Los habitantes de calle son un grupo social vulnerable debido al mayor riesgo de presentar problemas de salud. En varios estudios se ha reportado la alta prevalencia de HIV entre las personas sin hogar, lo que constituye un reto para los servicios de salud (48-51).

Un alto porcentaje (69,4%) de los casos correspondió a tuberculosis pulmonar, lo que difiere de lo reportado en otros estudios (13,52,53), en los cuales se estableció una relación más estrecha con la tuberculosis extrapulmonar. Sin embargo, el tipo pulmonar de la enfermedad es más frecuente en los pacientes con niveles elevados de linfocitos CD4 (46), variable que no se tuvo en cuenta en este estudio. Las personas infectadas por el HIV en los países en desarrollo presentan tuberculosis como la primera manifestación del sida (54), situación similar a la del Meta, donde el 87,7 % de los casos de HIV que ingresaron al programa lo hicieron como casos nuevos.

Se reportó una alta mortalidad en los pacientes con infección concomitante en este estudio. La infección simultánea con el HIV se ha relacionado con el aumento de la mortalidad atribuible a la tuberculosis en otros estudios (55-57).

El departamento del Meta registra una prevalencia de tuberculosis y de infección concomitante con el HIV superior a la nacional (5). Según el plan estratégico “Colombia libre de tuberculosis, 2010-2015”, el departamento del Meta se sitúa

Cuadro 3. Descripción de variables y su asociación con el éxito del tratamiento[1]

Característica	N[2]	Éxito del tratamiento[3]		Ji al cuadrado (p)	Razón de prevalencia cruda ($IC_{95\%}$)	Razón de prevalencia ajustada ($IC_{95\%}$) *
		Sí (%)	No (%)			
Sexo				0,440 (0,5)		
Mujer	51	23 (45)	28 (55)		1	1
Hombre	168	67 (40)	101 (60)		1,15 (0,66-2,33)	1,32 (0,73-1,9)
Edad				0,003 (0,9)		
≥Mediana	109	44 (41)	65 (59)		1	1
<Mediana[£]	110	45 (41)	65 (59)		0,98 (0,80-1,25)	1,02 (0,86-1,35)
Afiliación al SGSSS[¥]				1,49 (0,22)		
Asegurado	179	77 (43)	102 (57)		1	1
No asegurado	40	13 (33)	27 (67)		0,74 (0,66-0,97)	0,67 (0,28-0,74)
Tipo de tuberculosis				0,019 (0,89)		
Pulmonar	152	62 (41)	90 (59)		1	1
Extrapulmonar	67	28 (42)	39 (58)		1,02 (0,80-1,30)	1 (0,68-1,5)
Condición de ingreso [¶]				6,48 (0,01)		
Previamente tratado	27	5 (18)	22 (81)		1	1
Nuevo	192	85 (44)	107 (56)		2,39 (1,3-9,6)	3,1 (1,6-14)

SGSSS: Sistema General de Seguridad Social en Salud

[1] Base de datos del programa departamental de tuberculosis para el periodo de estudio

[2] No se presentaron pérdidas

[3] Según la condición de egreso (curado y tratamiento terminado)

* Las razones de prevalencia y su intervalo de confianza de 95 % se obtuvieron a partir de un modelo de regresión binomial.

[£] Valor de la mediana: 34 años

[¥] Variable codificada de nuevo; se incluyen asegurados en los regímenes contributivo, subsidiado y en los especiales; entre los no asegurados se incluyeron los no afiliados (Sisben).

[¶] Variable codificada de nuevo: previamente tratados, incluidos todos los reingresos

en la situación 2 en cuanto a la expansión y fortalecimiento de la estrategia de “Alto a la tuberculosis” (24), es decir, registra una alta carga de enfermedad y el éxito del tratamiento es menor del 85 %. Según el presente estudio, la mayoría de los municipios que reportaron casos de infección concomitante en el periodo, también se encuentra en dicha situación. Esta situación se caracteriza por presentar una adecuada infraestructura de servicios de salud, con centros de referencia para los municipios propios y de otros departamentos (24), pero con debilidades en el sistema de información y en el seguimiento del tratamiento de los pacientes, lo cual se evidenció en la diferencia en la evaluación de la condición de egreso y en la baja tasa de éxito del tratamiento.

Esta última podría explicarse por la falta de cumplimiento (58) en la toma de los medicamentos y del tiempo de tratamiento, la mala absorción de medicamentos (59), y las interacciones farmacológicas entre las rifampicinas y dos familias de antirretrovirales (46). También, puede involucrar la dificultad del tratamiento en las personas con infección concomitante, quienes suelen presentar formas más graves de tuberculosis, situación similar a la referida en otros estudios (2,60) y que explicaría, asimismo, la tendencia decreciente de este indicador en el período de estudio.

En este estudio, los pacientes sin tratamiento antituberculoso previo tuvieron una mayor probabilidad de éxito del tratamiento, lo cual puede deberse a la presencia de cepas sensibles (13), a factores de cumplimiento del tratamiento (61,62), a las estrategias de educación en salud (63) y a los factores sociales determinantes en salud (64).

En comunicación personal con funcionarios departamentales y municipales del programa, estos atribuyeron los resultados aquí presentados a la ‘desverticalización’ del programa, a la falta de continuidad del personal de apoyo, a las fallas del programa y del trabajo colaborativo, y a los hechos de violencia, discriminación, rechazo y estigma propios de la región en el marco del conflicto armado.

Las limitaciones del estudio incluyeron la falta de información sobre los resultados de las pruebas de HIV, el hecho de que, en ocasiones, estas no se hicieron por decisión del paciente, la falla del programa en cuanto a la oferta o la falla administrativa en la práctica de la prueba, así como las propias del uso de fuentes secundarias de información, las cuales se solucionaron con el proceso de validación hasta donde fue posible.

Hay grupos de población vulnerables en los municipios en los cuales deben focalizarse las acciones para, así, mejorar la oportunidad del

diagnóstico y el tratamiento, y avanzar hacia la eliminación de la tuberculosis y la infección simultánea con el HIV.

Es importante evaluar los procesos de mejoramiento de la calidad de los datos en los sistemas de información, fortalecer las actividades de vigilancia y de colaboración recomendadas internacionalmente, analizar los algoritmos para la exclusión de la tuberculosis en personas infectadas por el HIV y hacer una vigilancia sistemática de los pacientes desde el ingreso hasta el egreso, así como integrar efectivamente las acciones que ofrecen los programas de control de la tuberculosis y del HIV/sida en los diferentes puntos de atención para establecer una red de atención efectiva y coherente, con una asistencia adecuada y orientada según los situaciones detectadas.

En futuros estudios será necesario abordar las situaciones culturales, regionales y de contexto que van más allá del enfoque analítico y del diseño propuesto para profundizar en la explicación de los resultados.

Conflicto de intereses

Uno de los investigadores tuvo vínculo laboral de 2011 a 2014 con la institución que suministró la información; no obstante, se tomaron todas las precauciones para que ello no afectara el proceso de investigación.

Financiación

Este estudio fue financiado por la Gobernación del Meta, Fondo Social para la Educación Superior, convocatoria de formación de capital humano de alto nivel para el departamento del Meta, 2015.

Referencias

1. **Organización Panamericana de la Salud.** Pese a los avances, la tuberculosis aún es la segunda causa de muerte por enfermedad infecciosa en las Américas. Fecha de consulta: 16 de enero de 2017. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6532%3A2012-pese-avances-tuberculosis-segunda-causa-muerte-enfermedad-infecciosa-americas&catid=1443%3Aweb-bulletins&Itemid=135&lang=pt

2. **Brunello M, Neto F, Arcêncio R, Andrade R, Magnabosco G, Villa T.** Areas of vulnerability to HIV/TB co-infection in Southeastern Brazil. Rev Saúde Pública. 2011;45:556-7.

3. **Organización Mundial de la Salud.** Tuberculosis datos y cifras 2017. Fecha de consulta: 24 de marzo de 2017. Disponible en: http://www.who.int/campaigns/tb-day/2017/es/

4. **Organización Mundial de la Salud.** La tuberculosis en las Américas. Informe regional 2013. Epidemiología, control y financiamiento. Fecha de consulta: 20 de abril de 2017. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22954&Itemid=270

5. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del evento tuberculosis. 2016. Fecha de consulta: 15 de febrero de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Tuberculosis%20%202016.pdf

6. **Instituto Nacional de Salud.** Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. VIH/sida. 2014. Fecha de consulta: 17 de febero de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/ZIKA%20Lineamientos/PRO%20VIH%20-%20SIDA.pdf

7 **Instituto Nacional de Salud.** Informe del comportamiento en la notificación de VIH-sida hasta el periodo epidemiológico II del año 2017. Fecha de consulta: 17 de abril de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/VIH-SIDA%20PE%20XII%202017.pdf

8. **Silva-Reyes L, Llena N, Del Campo E, Mulet, Ván J, Smith A.** Aspectos clinicoepidemiológicos en pacientes con coinfección por sida y tuberculosis en la provincia de Santiago de Cuba. MEDISAN. 2016;20:5018-8.

9. **Cahn P, Pérez H, Ben G.** Tuberculosis and HIV: A partnership against the most vulnerable. J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic). 2003;2:106-23.

10. **van den Broek J, Borgdorff MW, Pakker NG, Chum HJ, Klokke AH, Senkoro KP, *et al*.** HIV-1 infection as a risk factor for the development of tuberculosis: A case-control study in Tanzania. Int J Epidemiol. 1993;22:1159-6.

11. **Bertolozzi M, Takahashi R, Hino P, Litvoc M.** O controle da tuberculose: um desafio para a saúde pública. Rev Med. 2014;93:83-9. https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v93i2p83-89

12. **Organización Mundial de la Salud.** Guías sobre la vigilancia del VIH de segunda generación. 2000. Fecha de consulta: 30 de abril de 2017. Disponible en: http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/secondgeneration_sp.pdf

13. **Palou E.** Tuberculosis y SIDA: una co-infección eficiente. Rev Médica Honduras. 2010;78:33-4.

14. **Organización Mundial de la Salud.** 68ª sesión del Comité Regional para las Américas. 2016. p. 1-46. Fecha de consulta: 26 de abril de 2017. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12276%3A2016-55th-directing-council-documents&catid=8811%3Adc-documents&Itemid=42078&lang=es

15. **Instituto Nacional de Salud.** Informe evento tuberculosis. 2015. Fecha de consulta: 23 de abril de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Tuberculosis%202015.pdf

16. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Circular 007/2015. Actualización de los lineamientos para el manejo programático de tuberculosis y lepra en Colombia. Bogotá: Minsalud; 2015.

17. **García-Pérez C.** Estratificación epidemiológica de riesgo. Rev Arch Médico Camagüey. 2013;17:121-8.

18. **Congreso de la República.** Ley 100/1993 de diciembre 27. Por la cual se crea el sistema de seguridad social integral y se dictan otras disposiciones. Bogotá: Imprenta Nacional; 1993.

19. **Congreso de la República.** Ley 789/2002 de diciembre 23. Por la cual se dictan normas para apoyar el empleo y ampliar la protección social y se modifican algunos artículos del Código Sustantivo de Trabajo. Bogotá: Imprenta Nacional; 2002.

20. **Ministerio de la Protección Social.** Decreto 3518/2006 de octubre 9. Sistema de Vigilancia en Salud Pública. Bogotá: Imprenta Nacional; 2006.

21. **Ministerio de Salud.** Resolución 412/2000 de febrero 25. Guías de promoción de la salud y prevención de enfermedades en la salud pública. Bogotá: Imprenta Nacional; 2000.

22. **Ministerio de la Protección Social.** Circular 058/2009 de septiembre 11. Lineamientos para el manejo programático de tuberculosis y lepra. Bogotá: Imprenta Nacional; 2000.

23. **Congreso de la República de Colombia.** Plan decenal de salud pública 2012 - 2021. Bogotá: Imprenta Nacional; 2013.

24. **Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud.** Plan estratégico Colombia libre de tuberculosis, 2010-2015, para la expansión y fortalecimiento de la estrategia alto a la TB. Bogotá: Ministerio de la Proteccion Social; 2009.

25 **Instituto Nacional de Salud.** Protocolo de vigilancia en salud pública. Tuberculosis. 2016. Fecha de consulta: 2 de mayo de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/ZIKA%20Lineamientos/Tuberculosis%20PROTOCOLO.pdf

26. **Ministerio de la Protección Social.** Decreto 3039/2007 del 10 de agosto. Por medio del cual se adopta el Plan Nacional Salud Pública, 2007. Bogotá: Imprenta Nacional; 2007.

27. **Organización de la Naciones Unidas.** Objetivos de Desarrollo del Milenio. 2000. Fecha de consulta: 23 de mayo de 2017. Disponible en: http://www.un.org/es/millenniumgoals/

28. **Ministerio de Salud.** Resolución 8430/1993 del 4 de octubre. Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Bogotá: Imprenta Nacional; 1993

29. **Congreso de la República.** Ley 715/2001 del 21 de diciembre. Por la cual se dictan normas orgánicas en materia de recursos y competencias de conformidad con los artículos 151, 288, 356 y 357 (Acto Legislativo 01 de 2001) de la Constitución Política y se dictan otras disposiciones para organizar la prestación de los servicios de educación y salud, entre otros. Bogotá: Imprenta Nacional; 2001.

30. **Ministerio de Salud y Protección Social.** Análisis de la situación de salud. Colombia, 2015. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia; 2015.

31 **Ministerio de Salud y Protección Social.** Análisis de situación en salud, Meta. 2014. Fecha de consulta: 23 de mayo de 2017. Disponible en: http://old.huila.gov.co/documentos/2014/Salud/SaludPublica/Anlisis_de_Situacin_de_Salud_ASIS_Meta.pdf

32. **Centers for Disease Control and Prevention.** Treatment of tuberculosis. MMWR. 2003;52:1-77.

33. **Blanc FX, Havlir DV, Onyebujoh PC, Thim S, Goldfeld AE, Delfraissy J.** Treatment strategies for HIV-infected patients with tuberculosis: Ongoing and planned clinical trials. J Infect Dis. 2007;196:46-51. https://doi.org/10.1086/518658

34. **Tenorio-Gnecco A.** Evaluación de programas de salud. Rev Fac Ciencias Salud. 2008;10:48-57.

35. **Cáceres-Manrique FM, Orozco-Vargas LC.** Demora en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar en una región de Colombia. Rev Salud Pública. 2008;10:94-10.

36. **González-Martín J, García-García J, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, *et al*.** Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. Arch Bronconeumol. 2010;46:255-19.

37. **Castro C, Ricardo A, Zabaleta A, Llerena C, Puerto G.** Caracterización de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos de individuos positivos para HIV en Colombia. Biomédica. 2017;37:86-9. https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3112

38. **Peña C.** Evolución de la TBC en la Región Metropolitana entre 2001 y 2005. Rev Chil Enf Respir. 2017;23:211-6.

39. **Gómez M, Achiong E, Morales J, Núñez V, Quintana H.** Evaluación de los indicadores operacionales del programa de la tuberculosis en Matanzas 2000-2006. Rev Med Elect. 2008;30:1-5.

40. **Organización Mundial de la Salud.** Tuberculosis y género. 2017. Fecha de consulta: 25 de mayo de 2017. Disponible en: http://www.who.int/tb/challenges/gender/page_1/es/

41. **García S, Yera P, Valdés D, Hernández H.** Comportamiento de la tuberculosis extrapulmonar en el Hospital Neumológico Benéfico Jurídico durante el quinquenio 1999-2003. Rev Cuba Med Trop. 2006;58:1-3.

42. **Martínez U, Mulen C.** Tuberculosis: perfil epidemiológico en la población perteneciente al Policlínico Universitario Vedado. Rev Cub Med Gen Int. 2006;22:1-3.

43. **Dávila M, Villafuerte Y, García A.** Consistency in reporting cases of TB and HIV, a tool to strengthen the integrated care for people with co-infection in México. Int J Integr Care. 2015;15:21-3.

44. **Organización Mundial de la Salud.** Global Tuberculosis Report. 2013. Fecha de consulta: 12 de mayo de 2017. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf

45. **Ochoa E, Armas L.** Tuberculosis: Directions for detection and control. La Habana: Handbook of Cuban Ministry of Public Health; 2002. p. 5.

46. **Úriz J, Repáraz J, Castiello J.** Tuberculosis en pacientes infectados por el VIH. An Sist Sanit Navar. 2007;30:131-42.

47. **Herrera T.** Grupos de riesgo para tuberculosis en Chile. Rev Chil Infectol. 2015;32:15-18. https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000200002

48. **Beijer U, Wolf A.** Prevalence of tuberculosis, hepatitis C virus, and HIV in homeless people: A systematic review and metaanalysis. Lancet Infect Dis. 2012;12:859-11. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70177-9

49. **Gao J, Zheng P.** Prevalence of TB/HIV co-infection in countries except China: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2013;8:e64915. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064915

50. **Instituto Nacional de Salud.** Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. Tuberculosis. 2014. Fecha de consulta: 13 de enero de 2017. Disponible en: http://www.clinicamedihelp.com/documentos/protocolos/PRO%20Tuberculosis.pdf

51. **Berbesi D, Segura A, Caicedo B, Cardona D.** Prevalencia y factores asociados al VIH en habitante de calle de la ciudad de Medellín, Colombia. Rev Fac Nac Salud Pública. 2015;33:200-5. https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v33n2a07

52. **Espinoza A, Gutiérrez H, Shimizu T.** Tuberculosis abdominal en un paciente VIH positivo. Rev Fac Med. 2016;10:1-2.

53. **Ramírez-Lapausa A.** Tuberculosis extrapulmonar, una revisión. Rev Esp Sanid Penit. 2015;17:3-11.

54. **Organización Mundial de la Salud.** Hablemos de tuberculosis y VIH. 2015. Fecha de consulta: 8 de febero de 2017. Disponible en: http://www.who.int/tb/challenges/hiv/talking_points/es/

55 **Yen Y, Rodwell T, Yen M, Shih H, Hu B, Li L, *et al*.** DOT associated with reduced all-cause mortality among tuberculosis patients in Taipei, Taiwan, 2006-2008. Int J Tuberc Lung Dis. 2012;16:178-84. https://doi.org/10.5588/ijtld.11.0034

56. **Sbrana E, Grise J, Stout C, Aronson J.** Co-morbidities associated with tuberculosis in an autopsy case series. Tuberculosis (Edinb). 2011;91(Suppl.1):S38-42. https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.10.008

57. **Stoneburner R, Laroche E, Prevots R, Singh T, Blum S, Terry P, *et al*.** Survival in a cohort of human immunodeficiency virus-infected tuberculosis patiens in New York City. Arch Intern Med. 1992;152:2033-4. https://doi.org/10.1001/archinte.1992.00400220061010

58. **Iseman M.** Treatment of multidrugresistant tuberculosis. N Engl J Med. 1993;329:784-91. https://doi.org/10.1056/NEJM199309093291108

59. **Berning S, Huitt G, Iseman M.** Malabsorption of antituberculosis medications by a patient with AIDS. N Engl J Med. 1992;327:1817-8. https://doi.org/10.1056/NEJM199212173272514

60. **Paixão L.** Perfil de casos de tuberculose notificados e fatores associados ao abandono, Belo Horizonte. Rev Saúde Pública. 2007;41:205-13. https://doi.org/10.1590/S0034-89102007000200006

61. **Dueñas D, Cardona M.** Factores relacionados con el cumplimiento del tratamiento en pacientes con tuberculosis, Pereira, Colombia, 2012-2013. Biomédica. 2016;36:423-31. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2904

62. **Rodrigues S, Monteiro L, Pacheco R.** Abandono do tratamento de tuberculose em coinfectados TB/HIV. Rev Esc Enferm USP. 2010:44:383-87. https://doi.org/10.1590/S0080-62342010000200020

63. **Howida E, Mohamed A, Ashraf E.** Assessment of the efficacy of Directly Observed Treatment with short course (DOTS) for pulmonary tuberculosis in Sharkia governorate. Egypt J Chest Dis Tuberc. 2013;4:173-85. https://doi.org/10.1016/j.ejcdt.2013.12.002

64. **Marmot M.** Social determinants of health inequalities. Lancet. 2005;365:1099-1104.

Biomédica 2018;38:80-6
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3801

ARTÍCULO ORIGINAL

Exposición y sensibilización a insectos en pacientes alérgicos en el trópico

Jorge Sánchez[1,2], Andrés Sánchez[1,3], Ricardo Cardona[1]

[1] Grupo de Alergología Clínica y Experimental, IPS Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[2] Fundación para el Desarrollo de las Ciencias Médicas y Biológicas, Cartagena, Colombia
[3] Corporación Universitaria Rafael Núñez, Cartagena, Colombia

Introducción. Los ácaros son una importante fuente de alérgenos en el trópico, pero poco se han estudiado otras fuentes potenciales de alérgenos prevalentes en la zona, como los insectos.
Objetivo. Determinar la relación entre la exposición y la sensibilización alérgica a cucarachas, mosquitos y hormigas, y su interacción con la sensibilización a los ácaros.
Materiales y métodos. Se incluyeron pacientes con pruebas de alergia para *Blatella germanica*, *Aedes aegypti*, *Solenopsis invicta*, *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides farinae* y *D. pteronyssinus*. Se determinó la sensibilización mediada por inmunoglobulina E (IgE) mediante pruebas intraepidérmicas. Para la exposición a los insectos en las casas, se utilizaron trampas para insectos rastreros y voladores.
Resultados. Se incluyeron 186 pacientes, de los cuales 73 (39,2 %) presentaron sensibilidad a uno de los insectos (cucarachas: 21 %, mosquitos: 29 %, hormigas: 26,3 %). De estos, 71 (97,2 %) presentaron sensibilización a los ácaros, en tanto que de los 148 pacientes sensibilizados a algún ácaro, solo el 47,9 % lo estaba a algún insecto. Se evaluaron 104 casas: en el 74 %, se encontraron cucarachas, en el 22%, hormigas, y en el 52 %, mosquitos. En los pacientes sensibilizados a los insectos, el número de insectos por casa tuvo una relación directa con el tamaño del habón aparecido durante la prueba cutánea: cucaracha, r=0,781 (p<0,001), mosquito, r=0,811 (p<0,001), hormiga, r=0,840 (p<0,001).
Conclusión. La sensibilización a los insectos es frecuente en la población alérgica del trópico y está fuertemente asociada con la sensibilización a los ácaros.

Palabras clave: ácaros; hipersensibilidad; hormigas; Culicidae; cucarachas.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3801

Exposure and sensitization to insects in allergic patients in the tropics

Introduction: Mites are an important source of allergens in the tropics. Other potential sources of allergens prevalent in the region such as insects have been poorly studied.
Objective: To determine the relationship between exposure and allergic sensitization to cockroaches, mosquitos, ants and the interaction with mite sensitization.
Materials and methods: We included patients with allergy tests for *Blatella germanica, Aedes aegypti, Solenopsis invicta, Blomia tropicalis, Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus*. IgE sensitization was evaluated by intraepidermal tests. Exposure to insects in houses was evaluated using traps for crawling and flying insects.
Results: A total amount of 186 patients were included; 73 (39.2%) of them were sensitized to an insect (cockroaches: 21%, mosquitoes: 29%, ants: 26,3%), 71 (97.2%) also had sensitization to mites. Of the 148 patients sensitized to mites, only 47.9% were sensitized to an insect. In total, 104 houses were evaluated: 74% had cockroaches, 22% ants, and 52% mosquitoes. Among insect-sensitized patients, the number of insects at home was directly related to the size of the weal generated during the skin test: Cockroaches, r=0.781, p<0.001; mosquitoes, r=0.811, p<0.001, and ants, r=0.840, p<0.001.
Conclusion: Sensitization to insects is frequent in allergic populations of the tropics and is strongly associated with sensitization to mites.

Key words: Mites; hypersensitivity; ants; Culicidae; cockroaches.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3801

Contribución de los autores:
Jorge Sánchez aportó la idea central del estudio.
Los tres autores contribuyeron por igual en la ejecución del trabajo y la redacción del manuscrito.

Las enfermedades alérgicas resultan de interacciones entre la constitución genética de cada individuo y la exposición a factores ambientales que intervienen en su desarrollo (1,2).

Dichas enfermedades suelen presentarse desde la infancia y su prevalencia se ha incrementado hasta alcanzar niveles de epidemia en varios países (3,4). Generalmente, tienen un origen alérgico, por lo que la atopia, que consiste en la producción de inmunoglobulina E (IgE) ante la exposición a una proteína usualmente inocua del ambiente, es indispensable para su desarrollo. El determinar la causa que provoca la producción de IgE en el paciente, permite un diagnóstico etiológico y la adopción de medidas específicas de evitación o de tratamientos moduladores como la inmunoterapia para alérgenos (5-7).

La sensibilización mediada por IgE puede determinarse mediante pruebas cutáneas o séricas con extractos biológicos de las fuentes sospechosas de contener las proteínas alergénicas que quieren probarse (8,9). En los estudios epidemiológicos, se ha demostrado que no todas las poblaciones están sensibilizadas a los mismos alérgenos. En varios países de Europa y en ciudades de Estados Unidos, los granos de polen son la principal causa de sensibilización (10). Por el contrario, en los países latinoamericanos y en las zonas de Europa con clima tropical, como las costas del Mediterráneo, la principal fuente de sensibilización son los ácaros (11,12). Estas variaciones se deben a factores ambientales propios de cada región, los cuales son responsables de la diversidad de la flora y la fauna en cada zona y, por ello, se requieren estudios epidemiológicos para caracterizar las principales fuentes biológicas a la que está expuesta una población y, así, determinar las fuentes que pueden producir una reacción mediada por IgE.

En las zonas húmedas del trópico, los principales ácaros asociados con la sensibilización alérgica provienen de la familia Pyroglyphidae: *Dermatophagoides farinae* (Der f) y *D. pteronyssinus* (Der p), y de la familia Glycyphagidae: *Blomia tropicalis* (Blo t) (12,13). Se debe tener en cuenta la gran diversidad de flora y fauna en el trópico, cuyos habitantes están expuestos a múltiples especies que son fuente potencial de alérgenos importantes (mascotas, hongos o insectos) (11,14).

Actualmente, el estudio de los insectos en las alergias se ha centrado principalmente en las enfermedades que resultan de su picadura, por ejemplo, la anafilaxia por abejas, avispas u hormigas, o la urticaria papular (anteriormente llamada prurigo estrófulo), que suelen ocurrir luego de la picadura de mosquitos o pulgas en una persona sensibilizada (15). Se ha estudiado menos el desarrollo de síntomas respiratorios después de la inhalación de los alérgenos de cucarachas, hormigas o mosquitos y su relevancia clínica (16). Aunque se sabe que estos insectos son prevalentes en el trópico (17,18), no se conoce la intensidad de la exposición en los hogares de las zonas urbanas, como tampoco si el grado de exposición se asocia con un mayor riesgo de presentar síntomas.

Considerando que la presencia de insectos y ácaros es endémica en el trópico, en este estudio se determinó la frecuencia de la sensibilización alérgica a cucarachas, mosquitos y hormigas en una población de pacientes con enfermedades alérgicas residentes en una ciudad tropical, y se evaluó el papel de la exposición a insectos en la reacción alérgica mediada por IgE. También, se exploró la relación entre este tipo de sensibilización a los insectos y los ácaros que son fuente de alérgenos endémicos.

Materiales y métodos

Aspectos geográficos y distribución de las fuentes

Los pacientes del estudio residían en Medellín, ciudad localizada en una región tropical con condiciones climáticas de humedad y temperatura que favorecen la proliferación de ácaros e insectos de diferentes especies (11). Por su ubicación entre montañas, suele haber vientos suaves que favorecen el transporte y la concentración de micropartículas, como los alérgenos presentes en el aire.

Selección de los pacientes y tipo de estudio

Los 186 sujetos incluidos en el estudio hacían parte de un grupo de 300 pacientes previamente estudiados (6,11,14) que asistieron a consulta en el Servicio de Alergología de la Universidad de Antioquia, entre 2009 y 2016.

Para el presente estudio, se seleccionaron los registros que incluyeran una evaluación con pruebas cutáneas de las fuentes de alérgenos objeto

Correspondencia:
Jorge Sánchez, Carrera 42 N° 7A sur-92, apartamento 1710, Medellín, Colombia
Teléfono: (300) 393 4000
jorgem.sanchez@udea.edu.co y jotamsc@yahoo.com

Recibido: 17/02/17; aceptado: 13/03/18

de análisis. No se establecieron restricciones de edad o sexo. Se incluyeron los pacientes con enfermedades alérgicas como conjuntivitis, dermatitis, asma o rinitis, según los criterios propuestos por la *Global Initiative for Asthma* (GINA), la iniciativa *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma* (ARIA) y por otras guías para conjuntivitis o dermatitis atópica (19,20). Se excluyeron aquellos pacientes con enfermedades no alérgicas que explicaran su cuadro respiratorio.

Evaluación de la atopia

Todos los pacientes se evaluaron mediante pruebas intraepidérmicas con extractos biológicos del laboratorio Leti (Madrid, España) o Inmunotek (Madrid, España) para las siguientes fuentes alergénicas: Blo t, Der p, Der f, Per a (*Periplaneta americana*), Aed a (*Aedes aegypti*) y Sol i (*Solenopsis invicta*); además, se evaluó la sensibilización al extracto completo de las fuentes indicadas. En adelante, se utilizarán indistintamente los nombres comunes o los científicos.

Se tuvieron en cuenta las recomendaciones internacionales para la lectura de las pruebas (21), considerándose como positiva una pápula mayor de 3 mm en relación con el control negativo. Se excluyeron aquellos pacientes con condiciones como el dermografismo o que consumieran medicamentos que pudieran alterar los resultados de las pruebas.

Exposición en las casas

En las casas de los pacientes que habían vivido durante más de cinco años en el mismo domicilio, se instalaron diariamente seis cartones engomados para capturar insectos y roedores, según las instrucciones de la empresa fabricante (Sodimac). Por cada una de las casas de los pacientes sensibilizados, se escogió al azar una de uno no sensibilizado a insectos, para evaluar si había asociación con el grado de exposición.

Se colocaron dos trampas en la cocina, dos en la sala de estar y dos en la alcoba del paciente: un cartón en el piso y un cartón en la pared. También, se dejaron diversas trampas para insectos voladores en cada casa a una distancia de metro y medio de cualquier obstáculo. Estas trampas se construyeron según las recomendaciones de la Federación Internacional de Sociedades de la Cruz Roja y de la Media Luna Roja (http://www.ifrc.org/es/how-to-help/learning-education-training/learning-platform1/): una botella de plástico de dos litros que se corta por la mitad y se llena con un litro de agua mezclada con 50 g de azúcar y un gramo de levadura, para luego insertar la parte superior en la parte inferior y recubrirla con un paño oscuro. Los mosquitos son atraídos por el dióxido de carbono liberado y quedan atrapados una vez se paran en el agua jabonosa.

Las trampas del día anterior se inspeccionaban diariamente en horas de la mañana para recolectar los especímenes y se cambiaban por nuevas, proceso que se repitió durante siete días. Se contaron las cucarachas del género *Blattela* ssp. o *Periplaneta* ssp., los mosquitos *Culex* ssp. o *Aedes* ssp. y las hormigas *Solenopsis* ssp. atrapados en las trampas, y se dispuso de la supervisión de un entomólogo para evitar errores en la clasificación, la identificación o el conteo de los insectos.

Análisis estadísticos

Los análisis se efectuaron con el programa IBM SPSS Statistics™, versión 21, para Windows. Los resultados se expresaron en porcentajes de frecuencia y en números absolutos. La relación entre las variables estudiadas se evaluó mediante la prueba de ji al cuadrado y la correlación de Spearman para variables no paramétricas.

Para evaluar si el patrón de sensibilización se asociaba con la presencia de múltiples enfermedades, se crearon dos variables dicotómicas: la variable ‘patrón multisistémico’ que incluyó a los pacientes con dermatitis y, además, rinitis o asma, y la variable ‘patrón multienfermedad’ que incluyó a aquellos, por lo menos, con dos enfermedades alérgicas.

Las pruebas de regresión logística multivariada se ajustaron con aquellas variables que pudieran influir en el patrón ‘multisistémico’ o ‘multienfermedad’. Se consideró significativo un valor de p menor de 0,05. Las comparaciones se hicieron según la edad y la atopia frente a ácaros o insectos.

Consideraciones éticas

Los sujetos del estudio pertenecían a una población previamente estudiada (6,11). La información obtenida se ajustó estrictamente a las directrices internacionales de la Declaración de Helsinki, en cuanto a la privacidad de los pacientes. Se obtuvo autorización de los comités de ética de la IPS Universitaria y de la Universidad de Antioquia

Resultados

Características generales de la población

La población de estudio incluyó a los 186 pacientes que cumplieron con los criterios de selección. La

edad promedio fue de 19 años, con una moda de 14 años (rango: 1 a 71); 103 (55,4 %) eran de sexo femenino.

Las enfermedades más frecuentes fueron las respiratorias (92,4 %) (cuadro 1). Todos los pacientes con síntomas nasales presentaban rinitis crónica. La dermatitis atópica fue más frecuente en los niños menores de 10 años (p<0,05). Entre las enfermedades estudiadas no se encontraron diferencias significativas con respecto al sexo. La frecuencia de atopia y de sensibilización a dos o más alérgenos, fue uniforme entre hombres y mujeres.

Sensibilización a ácaros e insectos

De los pacientes analizados, 153 (82,3 %) resultaron atópicos, principalmente a los ácaros, y la frecuencia de sensibilización a dos o más alérgenos fue alta (n=120; 64,5 %) (figura 1). De los pacientes sensibilizados a *Dermatophagoides* spp. lo eran para las dos especies evaluadas (Der f: 77,4 %, n=144, y Der p: 78,0 %, n=145). La sensibilización a cucarachas (21 %), mosquitos (29 %) u hormigas (26,3 %), se asoció con la sensibilización a dos o más agentes (p<0,001 para los tres insectos) y con el patrón 'multisistémico' (p=0,02, p=0,002 y p=0,007, respectivamente). La sensibilización a otras fuentes, como granos de polen, hongos, excrementos y fibras textiles, entre otros, fue menor de 15 % (los datos no se presentan). No hubo diferencias de distribución en cuanto al sexo.

La mayor parte de los pacientes sensibilizados a ácaros (n=101, 68 %) e insectos (n=47, 64,7 %), era menor de 20 años. Al dividir los grupos por cuartiles de edad, se observó que la sensibilización a los ácaros fue mayor en menores de 8 años (p=0,03) y que la sensibilización a insectos se presentaba principalmente entre los 9 y 14 años (p=0,04) (cuadro 2).

De los 73 pacientes sensibilizados a insectos, 71 (97,2 %) lo estaban a algún ácaro de la familia Pyroglyphidae, en tanto que de los 148 pacientes sensibilizados a algún ácaro, 71 (47,9 %) lo estaba a algún insecto. Al evaluar la relación entre ácaros e insectos, la sensibilización a los ácaros *Dermatophagoides* spp. incrementó 16,5 veces la probabilidad de estar sensibilizado a algún insecto ($IC_{95\%}$ 3,8-17,4; p<0,001), en tanto que la sensibilización a Blo t la incrementó 3,8 veces ($IC_{95\%}$ 2,09-7,2; p<0,001).

Por el contrario, la sensibilización a cualquiera de los insectos evaluados aumentaba entre 1,4 y 3,6 veces la probabilidad de sensibilización a un ácaro *Dermatophagoides* spp.. Con Blo t, ningún insecto alcanzó a ser estadísticamente significativo.

Cuadro 1. Datos generales de los 186 pacientes participantes en el estudio (n=186)

Datos generales	Pacientes n (%)
Mujer / Hombre	103/83 (44,6/55,4)
Edad (años) (rango)	Media: 14 años (1 a 71 años)
Síntomas respiratorios	172 (92,4)*
Asma	101 (54,3)
Rinitis	157 (84,4)
Síntomas oculares	105 (56,4)
Conjuntivitis	85 (45,7)
Queratoconjuntivitis	20 (10,8)
Síntomas cutáneos	64 (34,4)**
Dermatitis	50 (26,9)
Urticaria	29 (15,6)
'Multisistémico'	35 (18,8)
'Multienfermedad'	159 (85,5)

* 86 pacientes tenían asma y rinitis.
** 15 pacientes tenían dermatitis y urticaria.

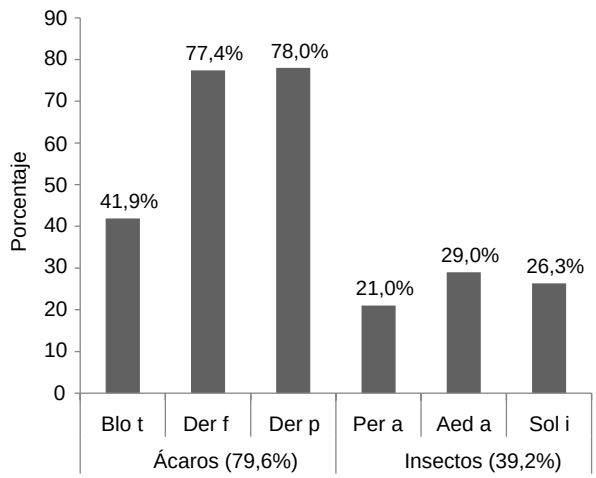

Figura 1. Sensibilización mediada por IgE a ácaros e insectos
Blo t: *Blomia tropicalis*; Der f: *Dermatophagoides farinae*; Der p: *Dermatophagoides pteronyssinus*; Per a: *Periplaneta americana*; Aed a: *Aedes aegypti*; Sol i: *Solenopsis invicta*

Cuadro 2. Grupos de edad y sensibilización a ácaros e insectos. Edad en cuartiles y su relación con sensibilización mediada por IgE a ácaros e insectos

Grupos de edad (años)	Ácaros, atopia (n=148) n (%)	Insectos, atopia (n=73) n (%)	p
0 a 8 (n=47)	31 (20,9)	7 (9,5)	0,03
9 a 14 (n=49)	49 (33,1)	30 (41)	0,06
15 a 27 (n=44)	42 (28,3)	21 (28,7)	>0,05
28 a 71 (n=46)	26 (17,5)	15 (20,5)	>0,05

Exposición a insectos y relación con la sensibilización

Se instalaron las trampas en 73 casas de pacientes sensibilizados a insectos y en igual número de casas de personas no sensibilizadas. El tiempo de recolección de siete días se cumplió en 50 y 54 casas, respectivamente. Las casas estaban distribuidas en toda la ciudad de Medellín.

El número de casas con insectos fue similar en los dos grupos: 39 (78 %) casas de pacientes sensibilizados y 40 (74 %) de no sensibilizados. El número de cucarachas, mosquitos y hormigas en ambos grupos fue similar (figura 2a). Entre los pacientes sensibilizados a insectos, se encontró una correlación directa estadísticamente significativa entre el tamaño de la pápula y el número de insectos, tanto en el caso de las cucarachas (figura 2b) y las hormigas (figura 2c), como en el de los mosquitos (figura 2d).

Discusión

En este estudio se encontró que la sensibilización a insectos es frecuente en la población alérgica del trópico y está fuertemente asociada con la sensibilización a ácaros. El interés de los estudios se ha centrado en la acción de los insectos como vectores de infecciones, como en el caso de algunas especies de mosquitos y la reciente epidemia de enfermedades virales, como el Zika y el chikungunya, reportada por la Organización Mundial de la Salud (http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/es/). También, se ha demostrado que la picadura de insectos como la hormiga, la avispa y la abeja, puede inducir reacciones sistémicas de anafilaxia.

En la población de Estados Unidos, se ha reportado que la sensibilización mediada por IgE a las cucarachas es un factor de riesgo importante para el asma (16,22), lo que resalta la importancia

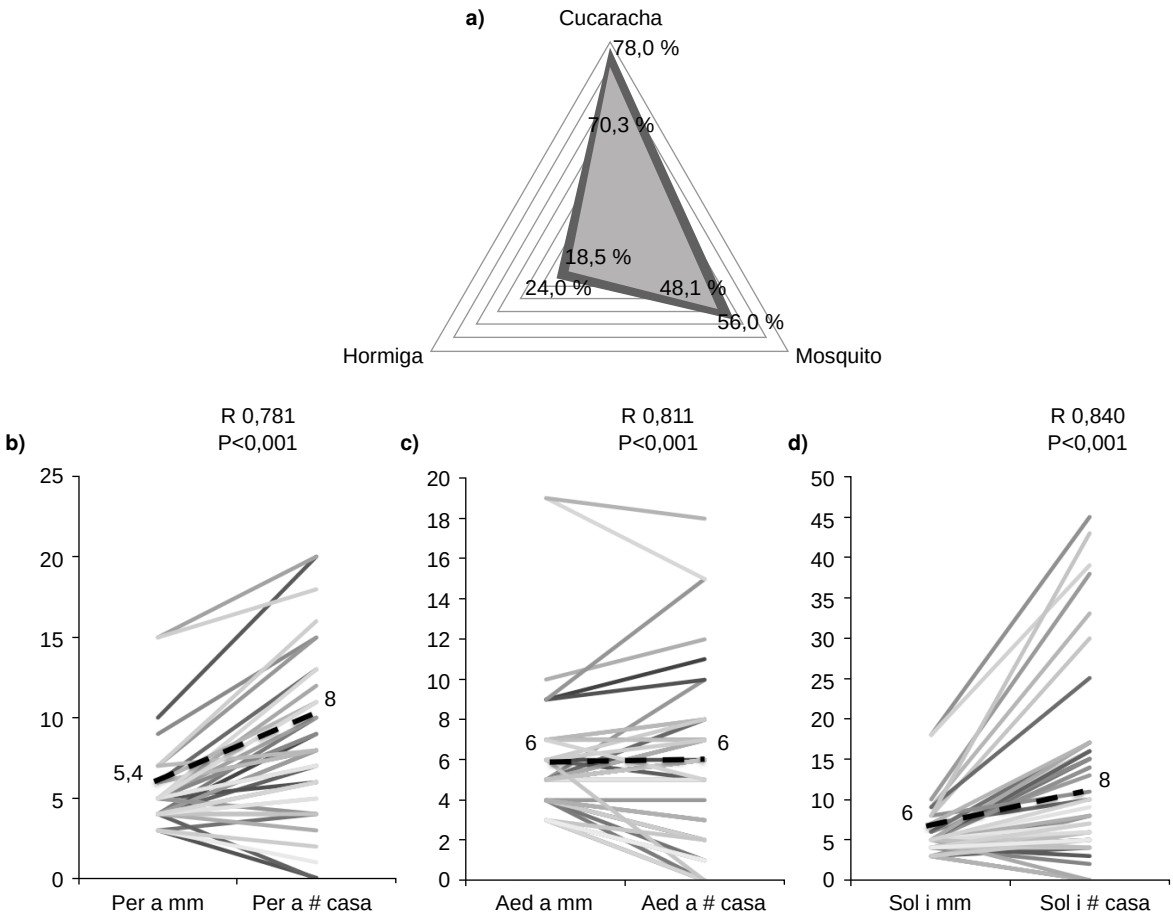

Figura 2. Exposición y reacción cutánea. **a.** La presencia de cucarachas, mosquitos y hormigas fue similar en las casas de los pacientes sensibilizados a los mosquitos (triángulo negro) y de los no sensibilizados (triángulo gris). Se observó una correlación entre la intensidad de la reacción cutánea y el número de cucarachas (**b**), de mosquitos (**c**), y de hormigas (**d**) en las casas.
Per a: *Periplaneta americana*; Aed a: *Aedes aegypti*; Sol i: *Solenopsis invicta*

de estudiar el papel de este insecto en otras enfermedades alérgicas, como la rinitis, así como el de otros insectos en el asma. Recientemente, se han descrito proteínas alergénicas tanto de mosquito como de hormiga, lo que hace necesario estudiar más a fondo su papel en las enfermedades alérgicas (17).

En este estudio se evaluaron la exposición y la sensibilización mediada por IgE a insectos en pacientes con asma o rinitis en una zona endémica para cucarachas, mosquitos y hormigas, y su relación con la sensibilización a los ácaros. Se encontró que uno de cada tres pacientes con asma o rinitis alérgica estaba sensibilizado a alguno de los insectos estudiados, lo que resalta la importancia de evaluar la relevancia de los insectos como provocadores de alergias en esta zona del trópico. Aunque los tres insectos estudiados son endémicos en nuestra población, fue más frecuente la sensibilización a mosquitos u hormigas que a cucarachas, lo que contrasta con lo reportado en estudios de Estados Unidos y Europa, donde, dada la poca prevalencia reportada de alergia a mosquitos y hormigas en las zonas urbanas, no se suelen tener en cuenta como fuentes de alérgenos (8,10).

A partir de un extracto de *Aedes aegypti* y suero de pacientes con asma, Cantillo, *et al.*, reportaron que la tropomiosina era el alérgeno más activo del mosquito, pero dicha reacción fue casi completamente inhibida al exponer el suero a incubación previa con tropomiosina de ácaros, lo que indica que la de los mosquitos tiene reación cruzada con la de los ácaros (18).

En el presente estudio, se observó que la sensibilización a ácaros fue significativamente mayor que a insectos y que el 97 % de los pacientes sensibilizados a los insectos también lo estaba a los ácaros. Además, la sensibilización a los ácaros ocurrió de forma más temprana que a insectos, resultados que apoyan la observación de Cantillo, *et al*., en cuanto a que la sensibilización mediada por IgE a insectos ocurre principalmente a causa de proteínas con reacción cruzada a las de los ácaros y que el mayor agente de sensibilización en esta reactividad cruzada son los ácaros, ya que menos de la mitad de los pacientes sensibilizados a *Dermatophagoides* spp. o *B. tropicalis* lo estuvieron también a algún insecto.

Haahtela, *et al.,* observaron que el tamaño de la pápula de la prueba cutánea puede ser un indicador de la relevancia clínica de una fuente alergénica, pues cuanto mayor sea este, mayor es la intensidad de la reacción inflamatoria (8). Al explorar la interacción entre los insectos, la mayoría de los pacientes resultó sensibilizada, por lo menos, a dos de los tres evaluados, aunque se observó poca correlación con el tamaño de la pápula en la prueba cutánea e, incluso, la correlación fue mayor con el habón de los ácaros, lo cual también apoyaría la posibilidad de que haya un alérgeno común entre las especies de insectos y ácaros, aunque la poca asociación entre las pápulas por los insectos apuntaría a que cada fuente tendría diferentes proteínas que actúan como alérgenos.

Independientemente de si la reacción a los insectos ocurre por reacción cruzada con los ácaros o por proteínas específicas de especie, el hecho de haber registrado la reacción mediada por IgE frente a las cucarachas, los mosquitos o las hormigas, obliga a estudiar más a fondo el papel de estas proteínas en las enfermedades alérgicas. Dado que no se contó con un grupo de control, no se pudo evaluar la relación de la sensibilización a insectos con el riesgo de desarrollar asma o rinitis, por lo que deberá estudiarse con un mejor diseño la relación entre la sensibilización a uno o varios insectos y los síntomas en dos o más sistemas (por ejemplo, síntomas cutáneos y respiratorios). Otra posible limitación del estudio fue haber usado extractos biológicos provenientes de dos laboratorios diferentes, aunque en los análisis comparativos no se observaron diferencias significativas en cuanto a la potencia del extracto según el tamaño de la pápula o la frecuencia de sensibilización.

La concentración de ácaros se ha asociado con una mayor frecuencia de sensibilización mediada por IgE a sus proteínas (12), por lo cual se propuso explorar si el número de insectos se asociaba con dicha sensibilización frente a cada uno de ellos. El número de las casas de los pacientes sensibilizados y las de los no sensibilizados en el que se encontraron insectos, fue similar; sin embargo, entre los pacientes con sensibilización a cucarachas, mosquitos u hormigas, sí hubo una correlación entre el tamaño de la pápula y el número de insectos encontrados, por lo cual las medidas de control entomológico pueden ser esenciales en los pacientes alérgicos a insectos como prevención secundaria frente al desarrollo de síntomas, pero, además, en los pacientes no sensibilizados a insectos, estos controles pueden servir como prevención primaria y, tal vez, ayudar a prevenir la sensibilización mediada por IgE.

En conclusión, las cucarachas, las hormigas y los mosquitos son importantes fuentes de alérgenos en la población del trópico, y uno de cada tres pacientes alérgicos puede tener una reacción respiratoria o nasal ante su exposición. Las medidas de control entomológico pueden prevenir esta exposición y reducir los síntomas. Es necesario que el control vaya dirigido también a otras fuentes, como los ácaros, dado el riesgo de reacción cruzada entre las proteínas.

Conflicto de intereses

Declaramos no tener conflicto de intereses.

Financiación

Agradecemos al Grupo de Alergología Clínica y Experimental de la Universidad de Antioquia, por su apoyo logístico y económico.

Referencias

1. **Zakzuk J, Acevedo N, Cifuentes L, Bornacelly A, Sánchez J, Ahumada V, *et al*.** Early life IgE responses in children living in the tropics: A prospective analysis. Pediatr Allergy Immunol. 2013;24:788-97. https://doi.org/10.1111/pai.12161

2. **Farrokhi S, Gheybi MK, Movahhed A, Dehdari R, Gooya M, Keshvari S, *et al*.** Prevalence and risk factors of asthma and allergic diseases in primary school children living in Bushehr, Iran: phase I, III ISAAC protocol. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2014;13:348-55.

3. **Forno E, Gogna M, Cepeda A, Yáñez A, Solé D, Cooper P, *et al*.** Asthma in Latin America. Thorax. 2015;70:898-905. https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207199

4. **Farajzadeh S, Esfandiarpour I, Sedaghatmanesh M, Saviz M.** Epidemiology and clinical features of atopic dermatitis in Kerman, a desert area of Iran. Ann Dermatol. 2014;26:26-34. https://doi.org/10.5021/ad.2014.26.1.26

5. **Sánchez J.** Adherence to allergen immunotherapy improves when patients choose the route of administration: Subcutaneous or sublingual. Allergol Immunopathol. 2015;43:436-41. https://doi.org/10.1016/j.aller.2014.04.011

6. **Sánchez J, Díez S, Cardona R.** Pet avoidance in allergy cases: Is it possible to implement it? Biomédica. 2015;35: 357-62. https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i3.2634

7. **Sánchez J, Cardona R, Caraballo L, Serrano C, Ramírez R, Díez S, *et al*.** Inmunoterapia con alérgenos: mecanismos de acción, impacto terapéutico y socioeconómico. Consenso de la Asociación Colombiana de Alergias, Asma e Inmunología. Biomédica. 2016;36:463-74. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3183

8. **Haahtela T, Burbach GJ, Bachert C, Bindslev-Jensen C, Bonini S, Bousquet J, *et al*.** Clinical relevance is associated with allergen-specific wheal size in skin prick testing. Clin Exp Allergy. 2014;44:407-16. https://doi.org/10.1111/cea.12240

9. **Hossny E, El-Sayed S, Abdul-Rahman N.** Sensitivity to five types of house dust mite in a group of allergic Egyptian children. Pediatr Allergy Immunol Pulmonol. 2014;27:133-7. https://doi.org/10.1089/ped.2014.0333

10. **Burbach G, Heinzerling L, Edenharter G, Bachert C, Bindslev-Jensen C, Bonini S, *et al*.** GA(2)LEN skin test study II: Clinical relevance of inhalant allergen sensitizations in Europe. Allergy. 2009;64:1507-15. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02089.x

11. **Sánchez J, Déez S, Cardona R.** Sensibilización a aeroalergenos en pacientes alérgicos de Medellín, Colombia. Rev Alerg Mex. 2012;59:139-47.

12. **Fernández-Caldas E, Puerta L, Caraballo L.** Mites and allergy. Chem Immunol Allergy. 2014;100:234-42. https://doi.org/10.1159/000358860

13. **Fernández-Caldas E, Puerta L, Mercado D, Lockey RF, Caraballo LR.** Mite fauna, Der p I, Der f I and *Blomia tropicalis* allergen levels in a tropical environment. Clin Exp Allergy. 1993;23:292-7. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1993.tb00325.x

14. **Sánchez J, Díez S, Cardona R.** Frequency of sensitization to animals in a tropical area. Rev Alerg Mex. 2014;61:81-9.

15. **Lozano AM, López JF, Zakzuk J, García E.** Urticaria papular y sus agentes causales en Colombia. Biomédica. 2016;36:632-45. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i4.3258

16. **Rabito FA, Carlson JC, He H, Werthmann D, Schal C.** A single intervention for cockroach control reduces cockroach exposure and asthma morbidity in children. J Allergy Clin Immunol. 2017;140:565-70. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016. 10.019

17. **Cantillo JF, Puerta L, Lafosse-Marín S, Subiza JL, Caraballo L, Fernández-Caldas E.** Identification and characterization of IgE-binding tropomyosins in *Aedes aegypti*. Int Arch Allergy Immunol. 2016;170:46-56. https://doi.org/10.1159/000447298

18. **Cantillo JF, Fernández-Caldas E, Puerta L.** Immunological aspects of the immune response induced by mosquito allergens. Int Arch Allergy Immunol. 2014;165:271-82. https://doi.org/10.1159/000371349

19. **Brozek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, Bonini S, Canonica GW, Casale TB, *et al*.** Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision. J Allergy Clin Immunol. 2010;126:466-76. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.06.047

20. **Sánchez J, Páez B, Macías A, Olmos C, de Falco A.** Atopic dermatitis guideline. Position paper from the Latin American Society of Allergy, Asthma and Immunology. Rev Alerg Mex. 2014;61:178-211.

21. **Heinzerling LM, Burbach GJ, Edenharter G, Bachert C, Bindslev-Jensen C, Bonini S, *et al*.** GA(2)LEN skin test study I: GA(2)LEN harmonization of skin prick testing: Novel sensitization patterns for inhalant allergens in Europe. Allergy. 2009;64:1498-506. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02093.x

22. **Sheehan WJ, Rangsithienchai PA, Baxi SN, Gardynski A, Bharmanee A, Israel E, *et al*.** Age-specific prevalence of outdoor and indoor aeroallergen sensitization in Boston. Clin Pediatr (Phila). 2010;49:579-85. https://doi.org/10.1177/0009922809354326

Biomédica 2018;38:87-94
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.4143

ARTÍCULO ORIGINAL

Micobacteriosis identificadas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Colombia entre 2012 y 2016

Claudia Llerena, Angélica Valbuena, Angie Paola Zabaleta

Grupo de Micobacterias, Laboratorio Nacional de Referencia,
Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. En los últimos años se ha observado un aumento en la prevalencia de micobacteriosis ocasionadas por micobacterias no tuberculosas, las cuales hoy se consideran como agentes patógenos emergentes. Su presencia depende de varios factores, como los antecedentes clínicos, el estado de salud de la persona afectada y la presencia de estos microorganismos en el agua, el suelo y los animales, entre otros.
Objetivo. Describir las micobacteriosis identificadas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud, entre 2012 y 2016.
Materiales y métodos. Se hizo un análisis retrospectivo que incluyó 273 pacientes con micobacteriosis. Las variables analizadas fueron el tipo de micobacteriosis, el agente etiológico y los factores de riesgo asociados.
Resultados. El 57,1 % de los casos presentó micobacteriosis pulmonar, el 26 %, cutánea, el 10,6 %, diseminada, y el 2,6 %, linfática. La comparación entre la forma pulmonar y la extrapulmonar evidenció que el complejo *Mycobacterium avium* se presenta con mayor frecuencia en las micobacteriosis pulmonares, en tanto que *M. abscessus* fue más frecuente en las extrapulmonares. Los pacientes con micobacteriosis pulmonar presentaban antecedentes de tuberculosis con mayor frecuencia que aquellos con las formas extrapulmonares.
Conclusión. Estos hallazgos resaltan la importancia del diagnóstico diferencial entre las especies del complejo *M. tuberculosis* y las micobacterias no tuberculosas, ya que estas últimas son resistentes genéticamente a los fármacos convencionales contra la tuberculosis.

Palabras clave: *Mycobacterium*; micobacterias no tuberculosas; factores de riesgo; coinfección; infecciones oportunistas; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.4143

Mycobacterioses identified in the National Reference Laboratory of Colombia from 2012 to 2016

Introduction: In recent years, there has been an increase in the prevalence of mycobacterioses caused by non-tuberculous mycobacteria, which are considered as emerging pathogens. Their presence depends on several factors such as the clinical history, the health status of the affected person, and the presence of these microorganisms in the water, the soil, and the animals, among others.
Objective: To describe the mycobacteria and the etiological agent identified in isolates received at the *Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias* of the *Instituto Nacional de Salud* between 2012 and 2016.
Materials and methods: We conducted a retrospective analysis of samples from 273 patients with mycobacterioses. We analyzed the following variables: mycobacteriosis type, etiological agent, and associated predisposing factors.
Results: 57.1% of the cases presented pulmonary mycobacteriosis; 26%, cutaneous; 10.6%, disseminated, and 2.6%, lymphatic. We found the *Mycobacterium avium* complex more frequently in pulmonary mycobacteriosis, while *M. abscessus* was more frequent in the extrapulmonary types of the disease. Patients with pulmonary mycobacteriosis had a history of tuberculosis more frequently than those with extrapulmonary forms.
Conclusion: These findings highlight the importance of the differential diagnosis between *M. tuberculosis* complex species and non-tuberculous mycobacteria since the latter are genetically resistant to conventional antituberculosis drugs.

Key words: *Mycobacterium*; non-tuberculous mycobacteria; risk factors; coinfection; opportunistic infections; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.4143

Contribución de los autores:
Todas las autoras participaron en la realización de los ensayos de laboratorio, la depuración y el análisis de la información, y en la escritura del documento.

En los últimos años se ha observado un aumento en la prevalencia de micobacteriosis ocasionadas por micobacterias no tuberculosas, las cuales se consideran agentes patógenos emergentes. Su presencia depende de los antecedentes clínicos y el estado de salud de la persona afectada, por ejemplo, inmunosupresión debida al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), alteraciones estructurales del pulmón, como las bronquiectasias, la fibrosis quística y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), las cuales favorecen la colonización de las vías respiratorias con estos gérmenes. A estos se suman hoy otros factores, como la gran variedad de entornos geográficos en los que se encuentran estos agentes patógenos y su relación con el medio ambiente, ya que tienen una amplia distribución en el agua, el aire, los suelos y los animales. En muchas ocasiones, los cuadros clínicos que producen se confunden con la tuberculosis, lo que favorece el avance de la enfermedad y el deterioro clínico, el cual puede llevar a la muerte cuando el tratamiento no es el adecuado (1-4).

En muchos de los estudios llevados a cabo a nivel mundial, se reconoce que la micobacteriosis con mayor prevalencia es la pulmonar, y los agentes etiológicos más frecuentes han sido *Mycobacterium avium intracellulare*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. marinum*, *M. xenopi* y *M. kansasii* (1,3,5,6).

En Colombia, el sistema de vigilancia en salud pública no exige el informe de las micobacterias no tuberculosas, lo cual dificulta establecer con qué frecuencia se presentan. En los trabajos a nivel nacional que documentan su presencia como agentes patógenos, se ha evidenciado un incremento en el número de casos, especialmente en personas infectadas con el HIV, o en quienes tienen enfermedad pulmonar o son sometidos a procedimientos cosmetológicos. Las especies identificadas son *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. avium intracellulare*, *M. abscessus*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum* y *M. avium*, entre otras (4,7-11).

Correspondencia:
Angélica Valbuena, Grupo de Micobacterias, Laboratorio Nacional de Referencia, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 220 7700, extensión 1260
yvalbuena@ins.gov.co

Recibido: 16/11/17; aceptado: 26/05/18

En este contexto, el objetivo de nuestro estudio fue describir los casos de micobacteriosis diagnosticados en el Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud entre el 2012 y el 2016.

Materiales y métodos

Se hizo un análisis retrospectivo de la base de datos del laboratorio que incluía a 273 pacientes en cuyos aislamientos se habían identificado micobacterias no tuberculosas. Para determinar la especie, se utilizaron los estuches comerciales Genotype CM™, que permite la identificación de las especies más comunes, y Genotype AS™ para aquellos casos en los que la prueba de Genotype CM™ no reconoció la especie micobacteriana. La técnica se basa en la extracción, la amplificación con iniciadores marcados con biotina y la hibridación inversa, proceso que se hizo siguiendo las indicaciones del fabricante (12,13).

Como controles internos, se utilizaron las cepas ATCC de *M. tuberculosis* (25618 ™), *M. avium* (15769 ™) y *M. fortuitum* (6841™), así como los controles de extracción y amplificación establecidos por el Laboratorio Nacional de Referencia.

La fuente de información fue el formato único de vigilancia de las micobacterias, recibido con cada uno de los casos. Las variables analizadas fueron edad, sexo, casos detectados por año, procedencia geográfica, tipo de micobacteriosis (pulmonar, cutánea, diseminada o linfática), agente etiológico identificado y factores predisponentes, entre los cuales se consideraron el tratamiento antituberculoso previo, la infección simultánea con el HIV (en aquellos casos en que se había registrado el resultado de esta prueba), la EPOC, la diabetes, la desnutrición y otros factores inmunosupresores no definidos. Los casos que no disponían de esta información se registraron como sin factor predisponente asociado.

Para el análisis estadístico, se utilizó la prueba z entre las variables de agente etiológico identificado y factor predisponente asociado para las formas pulmonar y extrapulmonar, y el porcentaje de casos recibidos a lo largo de los años de estudio. El área crítica de significación se estableció como p menor de 0,05, con un intervalo de confianza del 95 %.

Resultados

Entre 2012 y 2016, se diagnosticaron 273 casos de micobacteriosis en el Laboratorio Nacional de Referencia: 41 (15 %) casos en el 2012, 28 (10,3 %) en el 2013, 55 (20,1 %) en el 2014, 69

(25,3 %) en el 2015 y 80 (29,3 %) en el 2016. La comparación del número de casos recibido a lo largo de este periodo, tomando como referencia el 2012, evidenció un aumento significativo a partir de 2015 (p<0,05).

Los casos provenían de 23 entidades territoriales. Las que aportaron el mayor número fueron: Bogotá, con 64 (23,4 %), Atlántico, con 48 (17,6 %), Santander, con 40 (14,7 %), Antioquia, con 18 (6,6 %), y Bolívar con, 13 (4,8 %), casos en los que se encontró el 67 % de las micobacteriosis estudiadas (cuadro 1).

El 57,1 % de los casos correspondió a micobacteriosis pulmonar, el 26 %, a cutánea, el 10,6 %, a diseminada, el 2,6 %, a linfadenitis, y en el 3,7 % de los casos no se tenía la información para establecer el sistema comprometido (cuadro 2).

El principal agente causante de la micobacteriosis pulmonar fue el complejo *M. avium* en 81 casos (51,9 %). Entre los factores predisponentes asociados con esta micobacteriosis, se encontró el tratamiento previo para tuberculosis en 52 (33,3 %) casos; el 81 % de los pacientes era mayor de 40 años, con una mediana de edad de 57, y el 60 % correspondió al sexo masculino.

Mycobacterium abscessus fue la principal causa de enfermedad cutánea, con 39 casos (54,9 %), siendo la inmunosupresión el factor más frecuentemente asociado (7 %); el 76,1 % de estos pacientes tenía entre 21 y 50 años de edad, con una mediana de 34; el 78,9 % correspondió al sexo femenino.

El agente etiológico más frecuente en los casos de micobacteriosis diseminada fue el complejo *M, avium* con 20 casos; el 51 % de los pacientes con micobacteriosis diseminada era positivo para el HIV. El 82,7 % de estos pacientes tenía entre 21 y 60 años, con una mediana de 43; el 79,3 % correspondió al sexo masculino.

Solo se detectaron 7 (2,6 %) casos de linfadenitis por micobacteriosis, 5 (71,4 %) de ellos secundarios a infección por el complejo *M. avium*. Seis (85,7 %) fueron seropositivos para el HIV. Las edades de los pacientes oscilaban entre 4 y 39 años y el 71,4 % correspondió al sexo masculino.

En 5 de los 10 casos en que no había suficiente información para establecer la región anatómica afectada, se identificó el complejo *M. avium*, y el factor predisponente asociado más frecuentemente registrado fue el antecedente de tratamiento antituberculoso, en 4 casos. Las edades oscilaron entre 21 y 70 años y el 7 correspondió al sexo femenino.

Cuadro 1. Número y porcentaje de casos enviados al Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Nacional de Salud por las entidades territoriales, Colombia, 2012-2016

Entidad territorial	Casos enviados al Instituto Nacional de Salud n (%)
Bogotá	64 (23,4)
Atlántico	48 (17,6)
Santander	40 (14,7)
Antioquia	18 (6,6)
Bolívar	13 (4,8)
Valle del Cauca	10 (3,7)
Norte de Santander	10 (3,7)
Magdalena	8 (2,9)
Quindío	8 (2,9)
Cesar	8 (2,9)
Risaralda	7 (2,6)
Cundinamarca	6 (2,2)
Córdoba	5 (1,8)
Meta	5 (1,8)
Nariño	4 (1,5)
Cauca	4 (1,5)
La Guajira	4 (1,5)
Casanare	3 (1,1)
Huila	3 (1,1)
Caldas	2 (0,7)
Tolima	1 (0,4)
San Andrés	1 (0,4)
Sucre	1 (0,4)
Total	273 (100)

Al comparar las formas pulmonares y las extrapulmonares (cutánea, diseminada, linfática), se estableció que el complejo *M. avium* fue más el frecuente en la micobacteriosis pulmonar, en tanto que *M. abscessus* y *M. chelonae* lo fueron en las extrapulmonares (p<0,05) (cuadro 3).

El factor predisponente más frecuente en las formas pulmonares (p<0,05) fue el tratamiento previo para la tuberculosis (cuadro 3).

Discusión

Durante los cinco años analizados, se produjo un aumento de los casos confirmados como micobacteriosis y se observó una diferencia estadísticamente significativa a partir del 2015. Ello podría deberse a que, desde el 2014, el Laboratorio Nacional de Referencia utiliza para la identificación de la especie una técnica molecular más sensible y específica, la cual permite una mejor caracterización de las especies si se compara con las pruebas convencionales usadas en años anteriores.

Por otra parte, en la red de laboratorios se han implementado nuevos métodos, como la inmunocromatografía, y técnicas basadas en la amplificación de ADN, lo cual permite saber de forma

Cuadro 2. Tipo de micobacteriosis, agente etiológico identificado, factor predisponente, edad y sexo de los pacientes, Colombia, 2012-2016

Micobacteriosis pulmonar (n=156)	**n (%)**
Especie identificada	
Complejo *Mycobacterium avium*	81 (51,9)
M. abscessus	32 (20,5)
M. fortuitum	15 (9,6)
M. kansasii	6 (3,8)
M. chelonae	5 (3,2)
M. mucogenicum	4 (2,6)
M. szulgai	4 (2,6)
Mycobacterium spp.	4 (2,6)
M. simiae	3 (1,9)
M. gordonae	1 (0,6)
M. scrofulaceum	1 (0,6)
Factor predisponente asociado	
Personas con tratamiento previo para tuberculosis	52 (33,3)
Personas con infección simultánea con HIV	31 (19,9)
EPOC	10 (6,4)
Otros factores inmunosupresores	7 (4,5)
Diabetes	6 (3,8)
Desnutrición	1 (0,6)
Sin factor predisponente asociado	49 (31,4)
Micobacteriosis cutánea (n=71)	**n (%)**
Especie identificada	
M. abscessus	39 (54,9)
M. fortuitum	15 (21,1)
M. chelonae	10 (14,1)
Complejo *M. avium*	4 (5,6)
M. marinum	2 (2,8)
M. kansasii	1 (1,4)
Factor predisponente asociado	
Otros factores inmunosupresores	5 (7,0)
Diabetes	1 (1,4)
Persona con infección simultánea por HIV	3 (4,2)
Sin factor predisponente asociado	62 (87,3)
Micobacteriosis diseminada (n=29)	**n (%)**
Especie identificada	
Complejo *M. avium*	20 (69,0)
M. fortuitum	3 (10,3)
M. simiae	2 (6,9)
M. kansasii	2 (6,9)
M. abscessus	1 (3,4)
M. malmoense	1 (3,4)
Factor predisponente asociado	
Persona que vive con HIV	15 (51,7)
Otros factores inmunosupresores	5 (17,2)
Personas con tratamiento previo para tuberculosis	1 (3,4)
Diabetes	1 (3,4)
Sin factor predisponente asociado	7 (24,1)
Micobacteriosis linfática (n=7)	**n (%)**
Especie identificada	
Complejo *M. avium*	5 (71,4)
M. fortuitum	1 (14,3)
M. szulgai	1 (14,3)
Factor predisponente asociado	
Persona con infección simultánea por HIV	6 (85,7)
Sin factor predisponente asociado	1 (14,3)
Sin información sobre tipo de micobacteriosis (n=10)	**n (%)**
Especie identificada	
Complejo *M. avium*	5 (50)
M. abscessus	3 (30)
M. fortuitum	2 (20)
Factor predisponente asociado	
Personas con tratamiento previo para tuberculosis	4 (40)
Diabetes	1 (10)
Sin factor predisponente asociado	5 (50)

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

rápida si un aislamiento pertenece o no al complejo *M. tuberculosis,* así como una mayor remisión al Laboratorio Nacional de Referencia de aquellos cultivos en que se sospecha la presencia de micobacterias no tuberculosas. Además, desde el 2009 los lineamientos nacionales establecen el cultivo como método de diagnóstico en personas con sospecha de micobacteriosis (14,15).

El mayor número de casos se registró en Bogotá y en los departamentos de Atlántico y Santander, donde las redes de prestación de servicios de salud tienen más acceso al cultivo como método de diagnóstico.

En la mayoría de los estudios realizados en el país, se ha relacionado la presencia de micobacterias no tuberculosas con la presencia del HIV y con los procedimientos estéticos. No se registran estudios en los que se haya comparado el comportamiento de estas micobacterias como agentes patógenos causantes de la enfermedad pulmonar y de las formas extrapulmonares (4,7-10). En el 2017, Llerena, *et al.,* documentaron que las micobacterias causantes de enfermedad pulmonar entre el 2012 y el 2014 eran del complejo *M. aviar* (62,7 %) y *M. abscessus* (30,3 %).

El presente análisis incluyó información de dos años más y se evidenció que la tendencia fue similar. Sin embargo, en este estudio se identificaron como agentes etiológicos *M. simiae* y *M. mucogenicum,* los cuales no se habían descrito antes (11).

En el estado de São Paulo en Brasil, Ueki, *et al.,* determinaron que en 48 % de los 1.248 casos con micobacteriosis, esta era de tipo pulmonar, principalmente debida al complejo *M. avium,* con 51 %, dato similar a lo encontrado en nuestro estudio. Estos autores identificaron *M. kansasii* como el segundo agente más frecuente. En el presente análisis, se reconoció a *M. abscessus* como la segunda especie más frecuente, con 20,5 % de los casos. En los artículos consultados se reporta que la presencia de micobacterias no tuberculosas varía según la localización geográfica de los casos (16).

En Estados Unidos, Prevots, *et al.*, describieron las especies causantes de micobacteriosis pulmonar entre el 2004 y el 2006, y lo mismo hicieron Simons, *et al.*, en un análisis de 25 artículos publicados en diferentes países del este de Asia. En los dos estudios se reportaron las bacterias del complejo *M. avium* como los principales agentes involucrados, seguidas de *M. abscessus*, lo cual coincide

Cuadro 3. Comparación de micobacteriosis pulmonar y extrapulmonar, Colombia, 2012 -2016

Variable	Tipo de micobacteriosis				
	Pulmonar (n=156)		Extrapulmonar (n=107)		p
	n	%	n	%	
Especie identificada					
Complejo *M. avium*	81	51,9	29	27,1	<0,05
M. abscessus	32	20,5	40	37,4	<0,05
M. fortuitum	15	9,6	19	17,8	0,808
M. chelonae	5	3,2	10	9,3	<0,05
M. kansasii	6	3,9	3	2,8	0,568
M. mucogenicum	4	2,6	0	0	0,247
M. szulgai	4	2,6	1	0,9	0,623
M. simiae	3	1,9	2	1,9	0,668
M. gordonae	1	0,6	0	0	0,849
M. marinum	0	0	2	1,9	0,321
M. malmoense	0	0	1	0,9	0,849
M. scrofulaceum	1	0,6	0	0	0,849
Mycobacterium spp.	4	2,6	0	0	0,247
Factor predisponente asociado					
Personas con tratamiento previo para tuberculosis	52	33,3	1	0,9	< 0,05
Persona con infección simultánea por HIV	31	19,9	24	22,4	0,728
EPOC	10	6,4	0	0	----
Otros factores inmunosupresores	7	4,5	10	9,4	0,187
Diabetes	6	3,9	2	1,9	0,581
Desnutrición	1	0,6	0	0	0,849
Sin datos	49	31,4	70	65,4	< 0,05

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

con los datos de este estudio y es relevante si se tiene en cuenta que todos estos análisis corresponden a regiones geográficas diferentes (5,6,17).

En el presente estudio, se comparó la micobacteriosis pulmonar con las extrapulmonares para establecer las diferencias en cuanto a la presencia de los factores predisponentes asociados, y se comprobó que el antecedente de tratamiento antituberculoso fue uno de los más relevantes en las formas pulmonares, lo cual podría deberse a que la primera vez que los pacientes recibieron el tratamiento solo se les hizo una baciloscopia y no se hicieron cultivos en las muestras, por lo cual no se comprobó si se trataba de una micobacteria no tuberculosa; además, la tuberculosis pulmonar deja bronquiectasias como secuela y estas pueden ser colonizadas por dichas micobacterias. De ahí la importancia de utilizar pruebas para identificar las especies en todos los casos sospechosos de micobacteriosis con este antecedente, ya que las micobacterias no tuberculosas tienen la capacidad de colonizar el pulmón cuando se presentan daños estructurales como los producidos por el complejo *M. tuberculosis*, en especial cuando se hace un diagnóstico tardío (1,3,6,7).

Se encontró que la micobacteriosis pulmonar era más frecuente en personas mayores de 51 años, principalmente en los hombres mayores de 60. En el estudio de Prevots, *et al.*, se evidenció que la prevalencia de la micobacteriosis aumentaba siete veces en hombres y mujeres mayores de 60 años, lo cual coincide con los datos del presente estudio (17-19).

La micobacteriosis cutánea se asocia con traumas, heridas quirúrgicas o inyecciones y, especialmente, con procedimientos estéticos en los cuales usualmente se emplean sustancias sin control sanitario o no se cumplen los protocolos de desinfección, higiene y bioseguridad. Esta situación se ha descrito en varios países de Suramérica y afecta en un mayor porcentaje a las mujeres (8,9,19).

En un estudio realizado entre el 2004 y el 2007 por García, *et al.*, se analizaron 80 casos de problemas en la piel asociados con procedimientos estéticos y, en 33 (41,2 %) de ellos, se identificó alguna micobacteria no tuberculosa como causante de la infección: 57,5 %, *M. chelonae*, 24,2 %, *M. fortuitum*, y 18,2 %, *M. abscessus.* En Venezuela se evaluaron 49 pacientes que desarrollaron infección en la piel y los tejidos blandos después de una mesoterapia y, en 81,6 % de los casos, se identificó una micobacteria: *M. abscessus* en el 55 % de ellos, *M. fortuitum* en el 25 % y *M. chelonae* en el 10 %, datos similares a los de este estudio. Por otra parte, se evidenciaron algunas diferencias porcentuales con el estudio de García,

las cuales pueden estar relacionadas con el uso de pruebas de identificación fenotípica que dificultan la diferenciación de especies estrechamente relacionadas, como *M. abscessus* y *M. chelonae*, las cuales pueden identificarse con mayor precisión al emplear métodos moleculares (19-23).

La micobacteriosis diseminada y la linfática se deben generalmente al complejo *M. avium* y se asocian con inmunosupresión. Los especímenes ingresan principalmente por la vía gastrointestinal y se ha demostrado que algunos linajes del complejo son más virulentos y favorecen la invasión de las células HT-29, lo cual permite la diseminación a múltiples órganos, especialmente en personas inmunocomprometidas. En este estudio, la forma diseminada y la linfática presentaban inmunosupresión en 68,9 % y 85,7 % de los casos, respectivamente, lo cual coincide con lo reportado en la literatura mundial (24).

En algunos estudios se han identificado mutaciones en genes implicados en la producción y el control de la interleucina 12 y el interferón gamma, así como en el control de la reacción celular y el desarrollo hematopoyético, lo que hace a los individuos más propensos a padecer micobacteriosis diseminada (25).

En la revisión de Osorio, *et al.,* para caracterizar las complicaciones infecciosas pulmonares en pacientes con HIV tras 20 años del inicio de la terapia antirretroviral combinada, se encontró que las especies de mayor relevancia clínica fueron el complejo *M. avium*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. malmoense* y *M. simiae*, lo cual coincide con lo hallado en el presente estudio. Se ha establecido que los recuentos de CD4 menores de 50 células/µl y las cargas virales mayores de 100.000 copias/ml aumentan el riesgo de presentar micobacteriosis (17,26,27).

Ueki, *et al.,* describieron en su trabajo que el 97,8 % de los casos de micobacteriosis diseminada se debía al complejo *M. avium;* en los pacientes con infección concomitante con el HIV, esta especie también predominó (80,2 %) (16).

En los últimos años, el diagnóstico de las micobacterias no tuberculosas como agentes etiológicos se ha incrementado con el desarrollo y la introducción de métodos más sensibles en la rutina de los laboratorios, así como con el reconocimiento de nuevas especies asociadas con enfermedades (28-31). En Colombia, Castro, *et al.*, identificaron las siguientes especies de micobacterias utilizando la técnica de análisis de patrones de restricción: *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. terrae* y *M. malmoense*; al comparar estos datos con los nuestros, se observó que el uso de la metodología Genotype CM/AS™ ha permitido detectar especies como *M. kansasii*, *M. mucogenicum* y *M. simiae* (10,14).

Una limitación de este estudio la constituyó el diligenciamiento del formato único de vigilancia de las micobacterias, ya que la información no es completa en cuanto a la presencia de otros factores predisponentes asociados, así que, en los casos en que no se registró la información completa, no fue posible asegurar que estos no existieran, lo cual constituye un sesgo.

En todos los estudios citados, se resalta la importancia del diagnóstico diferencial entre especies del complejo *M. tuberculosis* y las micobacterias no tuberculosas. Asimismo, es importante que los médicos hagan la correlación con los criterios clínicos, radiológicos y bacteriológicos establecidos por la *American Thoracic Society* (ATS), mediante los cuales es posible hacer el diagnóstico adecuado y, en consecuencia, prescribir el tratamiento idóneo en estos casos (1,32).

El reto de los servicios de salud es fortalecer la capacidad de los médicos tratantes para sospechar, diagnosticar y tratar los casos de micobacterias no tuberculosas, pues cada vez se describen más especies asociadas con enfermedades. Es fundamental que las fuentes de información proporcionen datos que permitan correlacionar los factores predisponentes asociados ya descritos y documentar otros nuevos, incluidos el entorno ambiental de los pacientes, las actividades laborales y las intervenciones quirúrgicas, entre otros.

Agradecimientos

A los profesionales y a los integrantes de los equipos de apoyo técnico y administrativo de las secretarías de salud del país, así como a los del Laboratorio de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud.

Conflicto de intereses

Las autoras declaramos que no existe ningún tipo de conflicto de intereses.

Financiación

Este trabajo se hizo con recursos del contrato 757/13 suscrito entre el Departamento Administrativo

de Ciencia y Tecnología, Colciencias, y la Dirección de Redes en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud.

Referencias

1. **Farga V, Caminero J.** Tuberculosis. Tercera edición. Santiago de Chile: Editorial Mediterráneo; 2011. p. 449-67.
2. **Piersimoni C, Scarparo C.** Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobateria in inmmunocompetent patients. Lancent Infect Dis. 2008;8:323-34. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70100-2
3. **Katoch V.** Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). Indian J Med Res. 2004;120:290-304.
4. **Murcia M, Gómez J, Alvarado F, Bustillo J, Deivels E, Gómez B, *et al*.** Prevalence of mycobacterial in HIV positive patients in Bogotá. Rev Colomb Neumol. 2001;13:249-61. https://doi.org/10.1186/1471-2334-1-21
5. **Prevots R, Marras T.** Epidemiology of human pulmonary infection with non-tuberculous mycobacteria: A review. Clin Chest Med. 2015;36:13-34. https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.10.002
6. **Simons S, van Ingen J, Hsueh PR, van Hung N, Dekhuijzen PN, Boeree MJ, *et al*.** Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, eastern Asia. Emerg Infect Dis. 2011;17:343-9. https://doi.org/10.3201/eid170310060
7. **Montúfar F, Madrid C, Montufar M, Aguilar C, Saldarriaga C, Mesa M, *et al*.** Caracterización de pacientes hospitalizados con infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas en un hospital de alta complejidad en Colombia. Infectio. 2014;18:135-42. https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.06.002
8. **Garzón M, Orjuela D, Naranjo O, Llerena C.** Micobacterias no tuberculosas en Colombia, 1995-2003. Inf Quinc Epidemiol Nac. 2005;10:161-76.
9. **García L, Garzón M, Orjuela D, Mejía G, Llerena C.** Micobacterias no tuberculosas asociadas a procedimientos de mesoterapia en Colombia, 2004-2007. Infectio. 2010; 14:93-6. https//doi:10.1016/S0123-9392(10)70096-5
10. **Castro C, Puerto G, García L, Orjuela D, Llerena C, Garzón M, *et al*.** Identificación molecular de micobacterias no tuberculosas mediante el análisis de los patrones de restricción, Colombia 1995-2005. Biomédica. 2007;27:439-46. https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i3.206
11. **Llerena C, Valbuena Y, Zabaleta A, Gómez T.** Enfermedad pulmonar causada por complejo *Mycobacterium avium* y *M. abscessus*. Acta Médica Colombiana. 2017;42:26-9.
12. **Hain Lifescience.** Genotype Mycobacterium CM™. Versión 1.0. Hardwiesenstraße, Nehren: Hain Lifescience; 2011.
13. **Hain Lifescience.** Genotype Mycobacterium AS™. Versión 1.0. Hardwiesenstraße, Nehren: Hain Lifescience; 2010.
14. **Russo C, Tortoli E, Menichella D.** Evaluation of the new genotype *Mycobacterium* assay for identification of mycobacterial species. J Clin Microbiol. 2006;44:1769-75. https://doi.org/10.1128/JCM.44.2.334-339.2006
15. **Dirección General de Salud Pública, Ministerio de la Protección Social.** Circular externa 058 de 2009. Lineamientos para el manejo programático de tuberculosis y lepra en Colombia. Bogotá: Ministerio de la Protección Social; 2009. Fecha de consulta: 15 de febrero de 2018. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/circular-externa-0007-de-2015.pdf.
16. **Ueki S, Martins M, Telles M, Virgilio M, Giampaglia C, Chimara E, *et al*.** Nontuberculous mycobacteria: Species diversity in Sao Paulo state, Brazil. J Bras Patol Med Lab. 2005;41:1-8. https://doi.org/10.1590/S1676-24442005000100003
17. **Prevots D, Shaw P, Strickland D, Jackson L, Raebel M, Blosky M.** Nontuberculous mycobacterial lung disease prevalence at four integrated health care delivery systems. Am J Respir Crit Care Med. 2010;182:970-6. https://doi.org/10.1164/rccm.201002-0310OC
18. **Valdivies J, Sánchez R, Fernández S, Osés L.** Síndrome de Lady Windermere como causa de tos crónica. A propósito de un caso. An Fac Med. 2015;76:285-7. https://doi.org/10.15381/anales.v76i3.11241
19. **Rivera O, Guevara A, Escalona A, Oliver M, Pérez A, Piquero J, *et al*.** Infecciones en tejidos blandos por micobacterias no tuberculosas secundarias a mesoterapia. ¿Cuánto vale la belleza? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006;24:302-6. https://doi.org/10.1157/13089664
20. **Sanudo A, Vallejo F, Sierra M, Hoyos J, Yepes S, Wolff J, *et al*.** Nontuberculous mycobacteria infection after mesotherapy: Preliminary report of 15 cases. Int J Dermatol. 2007;46:649-53. https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2007.02976.x
21. **Munayco C, Grijalva C, Culqui D, Bolarte J, Suárez-Ognio L, Quispe N, *et al*.** Outbreak of persistent cutaneous abscesses due to *Mycobacterium chelonae* after mesotherapy sessions, Lima, Perú. Rev Saúde Pública. 2008;42:146-9. https://doi.org/10.1590/S0034-89102008000100020
22. **García X, Barnadas M, Dalmau J, Coll P, Gurgui, Alomar A.** *Mycobacterium abscessus* infection secondary to mesotherapy. Clin Exp Dermatol. 2008;33:658-9. https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2008.02869.x
23. **Carbonne A, Brossier F, Arnaud I, Bougmiza I, Caumes E, Meningaud J, *et al*.** Outbreak of nontuberculous mycobacterial subcutaneous infections related to multiple mesotherapy injections. J Clin Microbiol. 2009;47:1961-4. https://doi.org/10.1128/JCM.00196-09
24. **Wu U, Holland S.** Host susceptibility to non-tuberculous mycobacterial infections. Lancet Infect Dis. 2015;8:968-80. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00089-4
25. **Bustamante J, Boisson-Dupuisa S, Abel L, Casanova J.** Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: Genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN-γ immunity. Semin Immunol. 2014;26:454-70. https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.008
26. **Osorio J, Álvarez D, Barreto J, Casanova M, Vargas H, Giraldo G, *et al*.** Infecciones pulmonares en pacientes con VIH 20 años después de la terapia antiretroviral combinada. ¿Qué ha cambiado? Infectio. 2015;20:180-9. https//doi.org/10.1016/j.infect.2015.08.002
27. **Barnes A, Rojo S, Moretto H.** Prevalencia de micobacteriosis y de tuberculosis en pacientes de un hospital de referencia de la provincia de Córdoba. Rev Argent Microbiol. 2004;36:170-3.

28. **Telenti A, Marchesi F, Bals M, Bally F, Bodmer T.** Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 1993;31:175-8.

29. **Tobler N, Pfunder M, Herzog K, Frey J, Altwegg M.** Rapid detection and species identification of *Mycobacterium spp*. using real-time PCR and DNA-Microarray. J Microbiol Methods. 2006;66:116-24. https//doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.016

30. **Ng E, Wong M, Poon T.** Advances in MALDI mass spectrometry in clinical diagnostic applications. Top Curr Chem. 2014;336:139-75. https://doi.org/10.1007/1282012413

31. **Alcaide F, Palop-Borrás B, Domingo D, Tudó G.** Aplicación de la espectrometría de masas en micobacterias. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016;34(Supl.2):31-5. https://doi.org/10.1016/S0213-005X(16)30188-4

32. **Griffith D, Aksamit T, Brown-Elliott B, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, *et al*.** ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee; American Thoracic Society; Infectious Disease Society of America. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of non-tuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2007; 175:367-416. https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST

Biomédica 2018;38:95-105
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3940

ORIGINAL ARTICLE

Novel larvicide tablets of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*: Assessment of larvicidal effect on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Colombia

Wilber Gómez-Vargas[1], Kelly Valencia-Jiménez[2], Guillermo Correa-Londoño[3], Faiber Jaramillo-Yepes[2]

[1] Instituto Colombiano de Medicina Tropical-Universidad CES, Sabaneta, Colombia
[2] Centro de la Ciencia y la Investigación Farmacéutica, Sabaneta, Colombia
[3] Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia

Introduction: *Aedes (Stegomyia) aegypti* is the vector for dengue, chikungunya, and Zika arboviruses. *Bti*-CECIF is a bioinsecticide designed and developed in the form of a solid tablet for the control of this vector. It contains *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) serotype H-14.
Objective: To evaluate under semi-field and field conditions the efficacy and residual activity of *Bti*-CECIF tablets on *Aedes aegypti* larvae in two Colombian municipalities.
Materials and methods: We tested under semi-field conditions in plastic tanks (Rotoplast™) four different *Bti* doses (0.13, 0.40, 0.66 and 0.93 mg/L) in the municipality of Apartadó, department of Antioquia, to assess *Bti*-CECIF efficacy (percentage of reduction of larval density) and the residual activity in water tanks containing *A. aegypti* third-instar larvae. The efficacy and residuality of the most lethal dose were subsequently evaluated under field conditions in cement tanks in the municipality of San Carlos, department of Córdoba.
Results: Under semi-field conditions, the highest tested dose exhibited the greatest residual activity (15 days) after which larval mortality was 80%. Under field conditions, the highest tested *Bti*-CECIF doses showed 100% mortality and exhibited a residual activity of seven days in 90% of the tanks.
Conclusion: *Bti*-CECIF tablets effectively controlled *A. aegypti* larvae under field conditions for up to seven days post-treatment.

Key words: *Aedes*; *Bacillus thuringiensis*; disease vectors; dengue; chikungunya virus; Zika virus; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3940

Nuevas tabletas larvicidas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*: evaluación del efecto larvicida sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Colombia

Introducción. *Aedes (Stegomyia) aegypti* es el vector de los arbovirus del dengue, el chikungunya y el Zika. Para el control de este vector, se diseñó y desarrolló un bioinsecticida en presentación de tableta sólida, el *Bti*-CECIF, que contiene *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) de serotipo H-14.
Objetivo. Evaluar en condiciones de 'semicampo' y de campo, la eficacia y la actividad residual de las tabletas de *Bti*-CECIF en larvas de *A. aegypti* en dos municipios colombianos.
Materiales y métodos. En el municipio de Apartadó, departamento de Antioquia, se probaron bajo condiciones de 'semicampo' en tanques de plástico de 250 l (Rotoplast™) cuatro dosis diferentes de *Bti* (0,13, 0,40, 0,66 y 0,93 mg/l) para evaluar la eficacia del *Bti*-CECIF (porcentaje de reducción de la densidad larvaria) y la actividad residual en tanques de agua que contenían larvas de tercer estadio de *A. aegypti*. La eficacia y el efecto residual de la dosis más letal fueron posteriormente evaluadas en tanques de cemento bajo condiciones de campo en el municipio de San Carlos, departamento de Córdoba.
Resultados. Bajo condiciones de 'semicampo', la mayor dosis probada exhibió la mayor actividad residual (15 días), después de lo cual la mortalidad de las larvas fue de 80 %. Bajo condiciones de campo, la máxima dosis probada de *Bti*-CECIF mostró una mortalidad de 100 % y exhibió una actividad residual de siete días en el 90 % de los tanques.
Conclusión. Las tabletas *Bti*-CECIF controlaron eficazmente *A. aegypti* en condiciones de campo durante siete días a partir de su aplicación.

Palabras clave: *Aedes*, *Bacillus thuringiensis*; vectores de enfermedades; dengue; virus chikungunya; virus Zika; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3940

Author's contributions:
Wilber Gómez-Vargas: Study design, fieldwork, and manuscript writing
Kelly Valencia-Jiménez: Development of *Bti*-CECIF tablets and review of the manuscript
Guillermo Correa-Londoño: Statistical analysis and manuscript writing
Faiber Jaramillo-Yepes: Development of *Bti*-CECIF tablets; drafting and review of the manuscript

Vector-borne diseases account for over 17% of all infectious diseases and are a significant contributing cause of human deaths worldwide (1). Dengue, chikungunya, and Zika arboviruses are transmitted by the vector *Aedes (Stegomyia) aegypti* and they represent a permanent global health threat with social and economic impacts (2).

Currently, dengue is the most frequent arboviral disease diagnosed in tropical and sub-tropical countries. Recently, it has been estimated that there are 390 million dengue infections per year, of which 96 million manifests with clinically apparent disease (3). In the Americas, a total of 580,395 cases of dengue were reported in 2017, of which 1,940 cases were of severe dengue and 306 cases were deaths (4). In Colombia, the estimated average of dengue infections per year between 2013 and 2017 was 91,454 cases, of which 1,728 were severe dengue, and 111 were deaths (Sivigila*, Instituto Nacional de Salud*) (5-9). In 2016, the reported incidence of dengue was 101,016 cases (99.1%) and 899 cases of severe dengue (0.9%) (8). Additionally, 26,279 cases of dengue were reported in 2017 (9).

Furthermore, the recent introduction of Zika and chikungunya arboviruses in the Colombian Caribbean region expanded throughout the entire country. In 2014 and 2015 a total of 106,763 and 360,570 chikungunya cases were reported, respectively (10), while up to the epidemiological week 52 of 2016, 19,435 cases of chikungunya virus were reported (11). Additionally, 106,660 cases of Zika virus were reported from the epidemiological week 32 of 2015 to the epidemiological week 52 of 2016 (12).

Dengue, chikungunya, and Zika arboviruses are a public health concern as they may lead to epidemics in large cities and metropolitan areas (13). For this reason, the main course of action to reduce transmission of these diseases is based on the control of the vector *A. aegypti* with insecticide aspersion, as well as larvicide control and management means to reduce breeding sites. The main vector-control strategy focuses today on insecticide aspersion, which can be expensive and difficult to maintain. For that reason, the World Health Organization (WHO) has proposed the use of biolarvicides such as *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) for the prevention and control of arboviral diseases (document CD55/16) depending on the particular conditions of each country (14).

Since 1950, one of the most successful strategies for controlling this vector has been the use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) bacteria, whose biolarvicidal effect is specific for controlling species of the Culicidae family, including *A. aegypti* (15-18). In Colombia, *Bti* is available and commercialized as "VectoBac 200G™", and contains *Bti* serotype H-14 as the bioactive ingredient. Once ingested by larvae, peptide toxins known as delta-endotoxins are activated. Delta-endotoxins are pore-forming toxins that bind to the gut epithelium and lyse cellular membranes, and ultimately lead to the death of *A. aegypti* larvae (15-18).

However, this commercially available product presents several drawbacks, including the fact that it is not locally produced and must, therefore, be imported, increasing its cost significantly. Furthermore, application volumes of this granular formulation vary and to properly dose it, a special equipment must be used to weigh the amount of required product. Additionally, the product is susceptible to physicochemical instability after package opening and given that VectoBac 200G™ is commercialized by a single company, its accessibility may be occasionally restricted.

In order to overcome these issues, at the *Centro de la Ciencia y la Investigación Farmacéutica*, CECIF, we designed and developed a bioinsecticide in a solid tablet presentation that contains *Bti* serotype H-14, the same bioactive ingredient of VectoBac 200G™, which will be referred to as *Bti*-CECIF in the present article.

In this study, we assessed the efficacy and residual activity of *Bti*-CECIF tablets on *A. aegypti* larvae under semi-field conditions in the municipality of Apartadó (department of Antioquia), as well as under field conditions in two neighborhoods of the municipality of San Carlos (department of Córdoba).

Materials and methods

Tablets

Throughout the product design and development process, efficacy trials were run at laboratory scale reporting the mortality percentage according to *Bti* serotype H-14 concentration. Additionally, different production processes were tested in order to

Corresponding author:
Wilber Adolfo Gómez-Vargas, Carrera 43A N° 52 sur-99, Sabaneta, Antioquia, Colombia
Telephone: (574) 305 3500, extension 2522
wgomez@ces.edu.co

Received: 23/06/17; accepted: 26/04/18

identify the appropriate method to compress this type of raw material, which were then validated by physicochemical and microbiological methods (unpublished data).

Once we identified a formulation that met the requirements of the accelerated pre-stability testing, we performed toxicity studies including acute oral toxicity, acute dermal toxicity and toxicity by inhalation, dermal sensitivity, dermal irritation, and ocular irritation (unpublished data). These tests are required to apply for the toxicological technical report issued by the *Instituto Nacional de Salud*.

Semi-field bioassay

Mosquitoes. We used third instar *A. aegypti* larvae obtained from an established colony at the *Instituto Colombiano de Medicina Tropical,* ICMT, located in Sabaneta, Antioquia. This colony was generated from eggs provided by the *Grupo de Entomología Médica* at the *Facultad de Medicina* of the *Universidad de Antioquia.* The larvae were bred in plastic trays and fed fish food. The adult mosquitoes were fed with 10% sugar solution and mouse blood every third day to obtain their eggs. The insectary was maintained at an average temperature of 27°C and a relative humidity of 60%, with a photoperiod of 12 h, according to the Gerberg methodology (19).

The colony was composed of field specimens collected in Medellín, where insecticide susceptibility has been evaluated in several populations using the standard WHO susceptibility test (20). The following insecticides have been tested: organophosphates (malathion, fenitrothion, temephos), and pyrethroids (deltamethrin, permethrin, lambda-cyhalothrin). Mosquitos were susceptible to malathion (>98% mortality), while there was some risk of resistance to other insecticides (80-95% mortality) (21). In Medellín, *Bti* biolarvicide is not regularly applied (personal communication, Dr. Guillermo Rúa).

Bti products. For field and semi-field experiments, we used 600 mg *Bti*-CECIF tablets containing 1.33% active ingredient per tablet and 5,240 ITU/mg. As a negative control, we used 600 mg tablets without *Bti*.

Study site. We conducted the semi-field experiments at the ICMT headquarters located in the municipality of Apartadó (7º53'28.4'' N and 76º37.69'' W; elevation 49 masl) following WHO guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides (20).

Experimental protocol for semi-field bioassay. We evaluated *Bti*-CECIF tablets efficacy and residual activity at the following doses: 0.13, 0.40, 0.66, and 0.93 mg/L. CECIF tablets lacking *Bti* (0 mg/L) were used as negative control. We used 20 250-L plastic tanks (Rotoplast™) placed in the shade. The tanks were randomly labeled (four tanks per treatment) and filled with 180 L of aqueduct water. We added single batches of 100 laboratory-bred *A. aegypti* third instar larvae plus 1 g of fish to each tank and after 2 to 3 hours we administered the corresponding *Bti*-CECIF dose. We placed the tablets directly into the water without agitation. We registered larvae mortality daily and removed dead larvae from the tanks. Water pH and temperature were recorded throughout the bioassay.

During the experiment, tanks were kept under roof, in the shade, and covered with nets in order to avoid waste disposal, mosquitos laying eggs, or the invasion of predator macroinvertebrates, as well as to prevent the escape of adult mosquitos. Water lost by evaporation was replaced once a week.

Once all larvae had either died or hatched, we assessed residual activity in those same tanks without adding any new tablets. To this end, each tank received a new batch of 50 *A. aegypti* third instar larvae on day 4. After 24 hours, larvae mortality was registered and followed daily. Again, once all larvae had either died or hatched, a second batch of 50 *A. aegypti* third instar larvae was added to each tank on day 10. This process was repeated on days 19 and 31 until no significant difference in residual activity was detected in larvae mortality between tanks treated with the highest dose of *Bti*-CECIF and the negative control (20).

Efficacy was assessed through percent reduction of larval density (% RLD) during the first week of evaluation while residual activity was assessed by measuring the duration of larvicide effect on a new batch of third instar larvae. The period of residual activity was defined as the day until which the % RLD was greater or equal to 80%. For this purpose, larval mortality was calculated at several time points post-treatment as follows: e1: mortality after one day of exposure to treatment (day 1, 5, 11, 20, and 32); e2: mortality after two days of exposure to treatment (day 2, 6, 12, 21, and 33), and so on, up to e4. These mortality data (e1 through e4) were adjusted to probit models in order to establish whether there was a relationship between mortality and the *Bti*-CECIF dose and between mortality and days post-treatment

for each of the *Bti*-CECIF doses tested, with the exception of the negative control in which no mortality was observed.

Statistical analysis. Data were tabulated in Microsoft Excel™ spreadsheet and statistical analysis was performed using Statgraphics Centurion XVI™, version 16.1.02 software. Following WHO recommendations (20), the post-treatment % RLD was calculated with the following formula: $\%RLD = \left(\frac{C-T}{C}\right)\times 100$, where C is the percentage survival in control tanks and T is the percentage survival in treated tanks during the same time period. However, given that the percentage survival in control tanks was of 100% in this study, the % RLD was calculated directly, i. e., 100-T.

Field bioassay

Study site. The field study was performed in two neighborhoods of the municipality of San Carlos (El Carmen and Porvenir), Córdoba (8º48'02" N and 75º42'08" W; elevation 25 masl) with an average temperature of 28°C. San Carlos has an urban population of 5,123 inhabitants (22), and is located 36 km from the capital city, Montería.

During the last trimester of 2014, San Carlos presented high infestation levels of immature *A. aegypti* (larvae and pupae): House index (HI): 22%; container index (CI): 4%, and Breteau index (BI): 25%. It was also reported that 63% of positive breeding sites containing immature vector were low tanks (*Secretaría de Salud de Córdoba*, 2014). We selected two neighborhoods in San Carlos, El Carmen and Porvenir, because they presented the highest infestation levels of immature populations of *A. aegypti* in the municipality.

Before initiating the study, we explained the goals of the project to the head of each participating household, and upon approval, they signed an informed consent form. The Ethics Committee of the ICMT approved this study (Act 54, February 27, 2015). This field study was performed following WHO guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides (20).

Experimental protocol for the field bioassay. In the selected neighborhoods, tanks naturally infested with *A. aegypti* larvae were identified and used to test the effectiveness and residual activity of the *Bti*-CECIF tablets (0.93 mg/L). A total of 21 randomly selected tanks were treated with *Bti*-CECIF tablets; as a negative control five randomly selected tanks were treated with tablets without *Bti* and as a positive control other five randomly selected tanks were treated with VectoBac 200G™ at a dose of 5 mg/L.

At the beginning of the experiment, we recorded data of larvae and pupae density at day 1 and day 3 pre-treatment. In order to assess the density of immature instars, we analyzed 20 spoonful samples taken with a 300 mL ladle tied to a long cable (~1 meter) that facilitated its handling. We measured the total sample volume in a graduated cylinder and calculated the total volume of the tank using its diameter and height. The number of *Bti*-CECIF tablets per tank was calculated based on the total tank volume regardless of the total amount of water contained in it at the time of treatment. Because of this, some of the tanks had an initial concentration of *Bti*-CECIF greater than 0.93 mg/L.

Once we administered the treatment, larval density (all instars) was assessed every 24 h for three days. After the third day, we measured it three times per week for four weeks to assess the residual activity.

The water content of tanks varied with water consumption and exchange (rain or aqueduct), leading to changes in bioactive ingredient concentration over time. At each time point, we estimated the bioactive ingredient concentration using the water volume registered for the day it was being measured and the number of tablets initially added to the tank (initial concentration of 0.93 mg/L assuming maximum volume capacity). Throughout the assay, we recorded water pH, changes in water level, and water temperature data and we registered as well the environmental temperature and the relative humidity for the municipality of San Carlos.

Statistical analysis. Collected data was tabulated in a Microsoft Excel™ spreadsheet and the statistical analysis was performed using Statgraphics Centurion XVI™, version 16.1.02 software.

Following WHO recommendations (20), we calculated the post-treatment percentage reduction of larval density (% RLD) based on the Mulla formula (1971) (23): $\%RLD=100 - \left(\frac{C_1}{T_1}\right) \times \left(\frac{C_2}{T_2}\right)\times 100$, where C_1 is the number of larvae in instars I, II, III, and IV in negative control tanks before administering the *Bti*-CECIF tablets; C_2 is the number of larvae in instars I, II, III, and IV in negative control tanks after administering the *Bti*-CECIF tablets; T_1 is the number of larvae in instars I, II, III, and IV in *Bti*-CECIF treated tanks before administering the *Bti*-CECIF tablets, and T_2 is the number of larvae in instars I, II, III, and IV in *Bti*-CECIF treated tanks after administering the *Bti*-CECIF tablets. An 80%

RLD was defined as the cutoff, so *Bti* residual activity was considered to last until the day in which % RLD was greater or equal to 80%. A logistic regression model was adjusted for efficacy as a function of the number of days post-treatment with *Bti*-CECIF tablets. For this model, tanks with residual activity ≥80% were coded as one (1), and those tanks in which there was no longer *Bti* residual activity (% RLD<80 %) were coded as zero (0).

Time-course analysis of Bti-CECIF tablet concentration. In order to estimate the change in the bioactive ingredient concentration produced by water consumption and exchange, we assumed a constant dilution rate and used an exponential model to estimate the dilution rate for each of the tanks: $Concentration = e^{-\kappa \times dpt}$, where κ is the dilution rate and dpt is the number of days post-treatment with *Bti*-CECIF tablets. High κ values indicate a fast dilution, while low κ values indicate a slow dilution.

Bti-CECIF residual activity between groups was compared by a variance analysis in which we defined the response variable as the last day at which treatment remained effective (% RLD≥80%) and subjected it to square root transformation prior to analysis.

Participants knowledge survey. Upon completion of the bioassay, a brief questionnaire was administered to the heads of the households participating in the study. Twenty-one structured surveys were administered by the two team members who had been assessing tablets efficacy (a biologist and a field assistant), including only the sampling units which would be assigned to the *Bti*-CEFIF treatment. We used the data-collection instrument previously described by Ocampo, *et al.* (24), after adapting it to the municipality context and the purpose of our study. The survey consists of 19 questions that assess participants knowledge regarding the vector and the use of *Bti*-CECIF tablets.

Results

Semi-field bioassay in Apartadó

During the experiment, the average temperature in Apartadó was 27.6°C ± 0.58 and the relative humidity, 92.6% ± 2.9. The tank water temperature ranged between 23.2 °C and 29.4 °C (average of 27.3 °C ± 0.72). The tank water pH ranged between 7.45 and 8.99 (average of 8.31 ± 0.29).

Bti-CECIF tablets efficacy assessment

Based on day 1 larval mortality data (table 1), a probit model was adjusted for *Bti* dose-dependent mortality. Using inverse prediction, we predicted a dose of 0.24 mg/L to achieve 80% mortality 24 h post-treatment (figure 1). The dose of 0.93 mg/L exhibited greater efficacy than the other *Bti*-CECIF tested dosages. As expected, there was no mortality in tanks treated with tablets without *Bti* (negative control) (table 1).

Residual activity assessment

In order to evaluate the residual activity of *Bti*-CECIF tablets on *A. aegypti* larvae throughout the 40 days of the experiment, a probit model was adjusted for each of the doses with a function of time of exposure. Mortality rates for each of the doses are shown in figure 2. No mortality was observed for negative controls (data not shown). During the entire duration of the experiment, the residual activity of the 0.66 and 0.93 mg/L doses was greater than that of all the other tested *Bti* doses.

For each of the tested doses, a probit model was adjusted for mortality as a function of post-treatment days. To this end, inverse predictions were obtained from the day at which 80 % mortality was expected considering the different exposure days (e1, e2, e3, and e4) (figure 3).

Table 1. Mortality rate of *Aedes aegypti* stage III larvae treated with different doses of *Bti*-CECIF tablets

Dose (mg/L)	Number of *Bti* tablets (180 L water)	Mortality (%)			
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
0.13	3	78.7	10.2	5.5	5.5
0.40	9	97.7	1.5	0.7	0
0.66	15	99.7	0.2	0	0
0.93	21	98.7	0.5	0.7	0
Control	3*	0	0	0	0

*Tablets without *Bti*

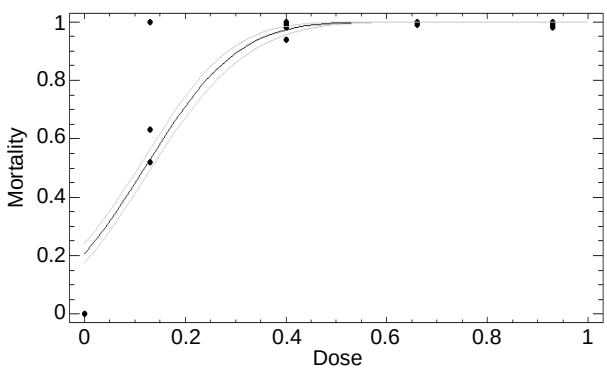

Figure 1. Probit model: *Bti* dose-dependent *Aedes aegypti* stage III larvae mortality in 180 L water tanks under semi-field conditions. Gray lines represent 95% confidence intervals.

The doses exhibiting greater residual activity were 0.66 mg/L and 0.93 mg/L. For the latter, we estimated that an 80 % mortality rate would be reached 15 days post-treatment after larvae were exposed for four days. Although there was no significant difference in the effect of these two doses, we chose the highest taking into consideration that in the field there would be water exchange and, thus, a decrease of the concentration of the active ingredient. For this reason, we selected the 0.93 mg/L dose for the test under field conditions in San Carlos, Córdoba.

Field bioassay in San Carlos

During the experiment, the average temperature in San Carlos was 27.6°C ± 1.93 and the relative humidity, 72.6 % ± 4.1. The tank water temperature ranged between 26°C and 35.1°C (average of 30.5 °C ± 1.83). The tank water pH ranged between 7.12 and 9.98 (average of 7.96 ± 0.51). All of the evaluated tanks were naturally infested with *A. aegypti* larvae and pupae.

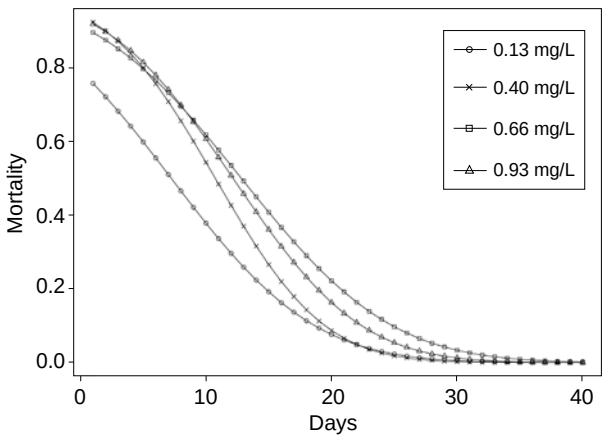

Figure 2. Expected larval mortality based on a probit model using four doses of *Bti*-CECIF tablets on stage III larvae of *Aedes aegypti* in 180 L water tanks under semi-field conditions

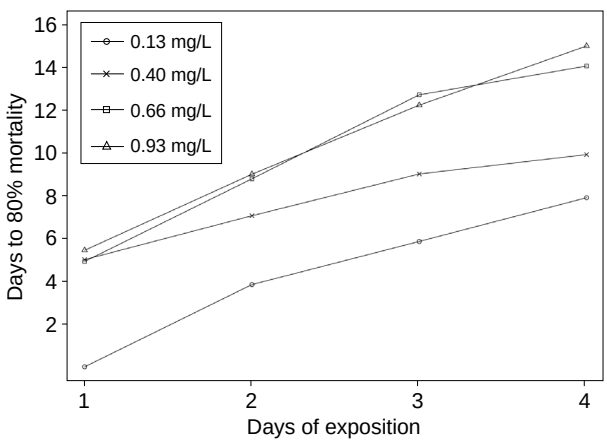

Figure 3. Mortality of 80% was achieved using four doses of *Bti*-CECIF tablets on stage III larvae of *Aedes aegypti* in 180 L water tanks under semi-field conditions. Days required to reach 80% mortality and days of exposure are graphed for the four different *Bti*-CECIF tablet doses.

Aedes aegypti percentage of larval density reduction in tanks treated with Bti-CECIF tablets

Based on the observed RLD percentages during the 34 days after administering the *Bti*-CECIF tablets at a dose of 0.93 mg/L, a logistic model for efficacy (% RLD≥80%) was adjusted to the number of days post-treatment ($p<0.0001$). The day for which a given probability of efficacy is expected can be estimated by performing an inverse prediction. Thus, if we have that there is a 0.9 probability that the product maintains its efficacy until around the seventh day, this means that seven days post-treatment approximately 90% of the tanks treated with *Bti*-CECIF tablets at a 0.93 mg/L dose would be expected to maintain a % RLD≥80% (figure 4).

Time-course analysis of Bti-CECIF tablet concentration

Figure 5 shows the observed change in concentration as a function of the number of post-treatment days during the bioassay for each tank. The differences among tanks corresponded to the variation due to water consumption and exchange patterns.

For each of the tanks, we used the following exponential model to establish the progression of concentration/dilution over time: $Concentration = e^{-\kappa \times t}$. We defined two groups of tanks: 1) Tanks exhibiting below-average dilution rates ($\kappa<0.094$), and 2) tanks exhibiting above-average dilution rates ($\kappa>0.094$). We did not find a statically significant effect of the dilution rate on product efficacy ($F=0.128$; error df=18; $p=0.725$).

The residual activity was not significantly different between *Bti*-CECIF tablets and VectoBac 200G™ ($F=0.009$; error df=24; $p=0.926$).

Participants knowledge survey

Participants age was 43 years old and younger. Regarding knowledge about dengue transmission, most participants (90%) were aware that chikungunya and dengue viruses are transmitted by mosquito bites. The majority of them (81%) also indicated that this mosquito breeds in water tanks and less than a third of participants (28%) knew that washing water tanks was a strategy to avoid mosquito reproduction. All of the participants (100%)

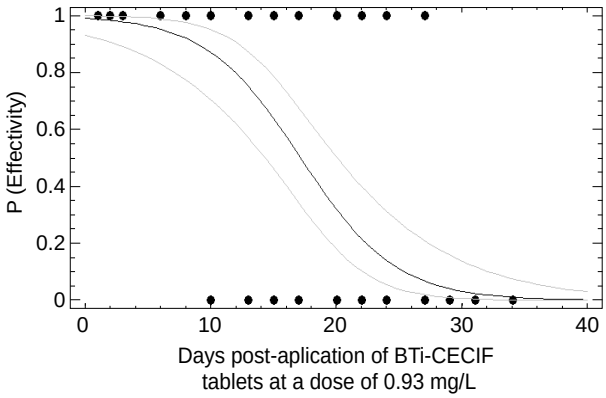

Figure 4. Logistic regression model for effectiveness (% RLD≥80) of *Bti*-CECIF tablets (dose 0.93 mg/L) as a function of the number of post-treatment days in tanks infested with *Aedes aegypti*. Gray lines represent 95% confidence intervals.

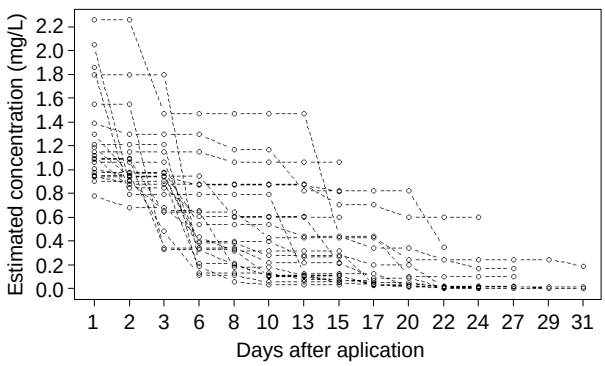

Figure 5. Post-treatment estimated concentrations of *Bti* in water tanks, bioassay field in San Carlos, Córdoba
Each line corresponds to a tank.

indicated that they used aqueduct water stored in cement tanks. About half (48%) of them stored the water for one to three days, 38% for four to seven days, and 14% for more than one week. Regarding tank washing, 95% of the participants said the washed their tanks, and 30% of these did so every two days, 45% on a weekly basis, and 25% every two weeks. Regarding the bioassay, 95% of the participants acknowledged that the administered tablets were efficient in killing mosquito larvae and that they had reduced their number. However, 62% of the responders indicated that the number of mosquitos (*A. aegypti* and *Culex* spp.) inside the house had not reduced.

Discussion

We report the efficacy and residual activity of *Bti*-CECIF tablets on *A. aegypti* larvae under semi-field and field experimental conditions in two Colombian municipalities. The use of *Bti* as a control strategy for *A. aegypti* larvae has been previously reported using different formulation and doses, particularly in countries where temephos resistance has been reported in *A. aegypti* populations (25,26).

In Colombia, the use of *Bti* is a complementary alternative for vector control in potable water tanks and other breeding sites (27-29), especially in regions where larvae have become resistant to temephos (27,29,30). The production and commercialization of a pharmaceutical formulation of *Bti* tablets developed and produced in Colombia would significantly reduce costs and increase product availability, leading to successful *A. aegypti* vector-control. Furthermore, this would contribute to proper dosage, as only the administration of a given number of tablets according to the tank volume would be required, as well as to product stability by packaging the material, which facilitates proper opening and closing of the package, thus guaranteeing the initial manufacturing conditions of the finished product.

During the first week of the semi-field bioassay, all of the tested doses (0.13, 0.40, 0.66 and 0.93 mg/L) of *Bti*-CECIF tablets (5,240 ITU/mg, active ingredient (a.i.): 1.33%) exhibited an efficacy of 100% for larval mortality. Regarding residual activity of *Bti*-CECIF tablets, the highest dose used in our study was enough to keep an 80% mortality rate for up to two weeks.

These results are in agreement with those reported by two studies in Brazil under semi-field conditions using *Bti* tablets VectoBacT™ (2,200 ITU/mg, a.i.: 37.4%). In one of these studies, doses of 3.5 and 7 mg/L were tested and it was found that a 100% *A. aegypti* larval mortality rate lasted up to two and three weeks, respectively (31). In the study by Zequi, *et al.* (32), VectoBacT™ tablets used at a 0.9 mg/L dose caused 100% mortality in instar IV *A. aegypti* larvae during the first eight days, and on day 15 the mortality rate was 98.8%. In another study, Melo-Santos, *et al.* (33), obtained a greater residual activity using *Bti* tablets (1,146 ± 2 ITU/mg, dose: one tablet/10 L, a.i. not reported) than in the above mentioned studies resulting in an *A. aegypti* larval mortality rate above 90% on days 13 through 35 for containers exposed to sunlight and on days 40 through 54 for containers protected from sunlight.

Several studies in different countries using commercially available and experimental *Bti* formulations under semi-field conditions, with and without

water replacement and under sunlight exposure or shade, have shown that *Bti* residual activity does not last longer than one month (31-40). This low *Bti* residual activity, especially in those bioassays using tablets and no water exchange, may be partly due to the excipient serving as food source for larvae. Treteau, *et al.* (41), reported that *Bti* residual activity was inversely proportional to organic matter content because membrane receptors in the *A. aegypti* larvae intestinal epithelium were covered by the ingested particles, thus interfering with *Bti* binding (42).

In Colombia, a previous study tested *Bti* tablets under semi-field conditions (36) and analyzed containers exposed to sunlight. In that study, contrary to most other studies, a residual activity of 12 weeks with larval mortality >80% was observed. Several studies conducted under field conditions in different countries with commercially available and experimental *Bti* tablets have shown that their residual activity is less than a month (25,37,43-46). In Colombia, several *Bti* formulations tested under field conditions (18,24,43,47) have yielded varied results depending on the study site.

In our study, the use of *Bti*-CECIF tablets dosed at 0.93 mg/L under field conditions in water tanks in the two selected neighborhoods of San Carlos, Córdoba, showed that on day 7, 90% of the tanks exhibited an 80% *A. aegypti* larvae mortality. These results are in agreement with Suárez, *et al.* (18), study in which by testing two product presentations (liquid and granular) in different types of tanks the authors showed that the *Bti* residual activity extended for seven to nine days. The study by Kroeger, *et al.* (43), evaluated commercially available *Bti* tablets (Culinex™, 33,000 ITU/mg, and 8,000 ITU/mg, no a.i. reported) which yielded, at the highest tested dose, a residual activity of 28 days in which larvae mortality was >90%.

Our results under semi-field conditions were different from under field conditions. Although semi-field bioassays are considered to be a useful method for the selection of new insecticides and/or doses to be applied under field conditions, they lack the ability to predict products real performance (25). This may be partly explained by several factors that may affect *Bti* products performance including environmental conditions such as water temperature, larval density, sunlight, and the association with filter feeders. Moreover, water exchange and uncontrolled water tank conditions, such as those present under field conditions, contribute to turning them into potential breeding sites and may also have a negative effect on *Bti* efficacy (35,37,48).

Following WHO recommendations (20), we surveyed community acceptance of our product as well as its relationship to vector control and related diseases. While the majority of the participants knew that *A. aegypti* is the vector for dengue and chikungunya viruses and that it breeds in water tanks, this knowledge is insufficient for successful mosquito control and disease prevention, as there is no direct relationship to their daily lives (43). Community acceptance of *Bti*-CECIF tablets was high since, on the one hand, they were aware of their effect on the *A. aegypti* larvae (information and periodic inspections), and on the other hand, the tablets did not affect water odor or appearance judged by the color (observation of the researchers).

Altogether, our data showed that the *Bti*-CECIF tablets designed and developed at our institution exhibited larvicidal properties comparable to other commercial products since no significant differences with VectoBac 200G™ (2,200 ITU/mg, 0.5% a.i.) were identified. In addition, *Bti*-CECIF tablets are easier to use, since the user is only required to count the necessary tablets to treat a given water volume, and there is no need of weighing the product before adding it to the water (39,43). Furthermore, the tablet has the advantage of sinking to the bottom of the tanks, where *A. aegypti* larvae are usually found, as compared to granular formulations that remain floating on the water surface for several days. Given that these tablets have selective toxicity, they are odorless and tasteless once diluted in water. These features make them an attractive option for the final user as they do not generate a negative perception of the water (appearance of dirty water) (25). The community acceptance was evidenced in the survey administered to adult inhabitants of participating households.

The Pan American Health Organization (PAHO) and WHO proposed an integrated management strategy for the prevention and control or arboviral diseases in endemic countries that includes six components (epidemiology, integrated vector management, social communication, patient care, laboratory, and environment) (49). Within the integrated vector management component, *Bti*-CECIF tablets could be useful for those endemic areas where *A. aegypti* populations are resistant to temephos and water for human consumption is stored for later use. Moreover, *Bti*-CECIF tablets

should be used in conjunction with other control strategies including the elimination of breeding sites by members of the community and space fumigation by health authorities when required. In addition, such control strategy must be integrated into the social communication component in order to achieve community acceptance and participation in its application.

One of the limitations of *Bti*-CECIF tablets identified in our field studies was the low residual activity of the *Bti* since product reapplication was required. However, this could be addressed in future experiments by including new dosing schemes, or by performing additional fieldwork in other regions in order to analyze and identify trends in product performance.

In Colombia, there are currently no bioinsecticide manufacturing facilities meeting good manufacturing practices (GMP) standards. Therefore, our group is currently developing a project to design and build GMP facilities for the production of *Bti*-CECIF tablets as it is technically and economically feasible.

In conclusion, our results strongly suggest that *Bti*-CECIF tablets have a larvicidal effect on *A. aegypti*, the known vector for dengue, chikungunya, and Zika arboviruses. Given the high rate of infection of these arboviruses in Colombia, successful and affordable vector control strategies, such as our *Bti*-CECIF tablets, are of pivotal importance to provide better public health care.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Catalina Alfonso-Parra and Dr. Marcos Restrepo-Isaza for their scientific advice; Dr. Guillermo Rúa for the supply of *A. aegypti* eggs; Gaviota Lopera, Diana Cabarcas, Elkin Monterrosa, and John Edison Bedoya for their technical support, and especially the members of the communities of El Carmen and Porvenir in San Carlos, Córdoba.

Financing

This work received the financial support of the *Sistema Nacional de Ciencia y Tecnología,* Colciencias, grant No. 381-2015, and of CECIF and ICMT-Universidad CES.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. **Musgrove P, Creese A, Preker A, Baeza C, Anell A, Prentice T.** Health Systems: Improving perfomance. Geneva: World Health Organization; 2000.
2. **Gürtler RE, Garelli FM, Coto HD.** Effects of a five-year citywide intervention program to control *Aedes aegypti* and prevent dengue outbreaks in northern Argentina. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3:e427. https://doi.org//10.1371/journal.pntd.000042
3. **Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, *et al*.** The global distribution and burden of dengue. Nature. 2013;496:504-7. https://doi.org//10.1038/nature12060
4. **Organización Panamerica de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Casos reportados de dengue en las Américas, 2017. Accessed: March 5, 2018. Available from: http://www.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-nacional/9-dengue-pais-ano.html
5. **Instituto Nacional de Salud de Colombia.** Informe del evento dengue, Colombia, 2013. Accessed: March 5, 2018. Available from: http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Dengue 2013.pdf
6. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del evento dengue, Colombia, 2014. Accessed: March 5, 2018. Available from: http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Dengue 2014.pdf
7. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del evento dengue, Colombia, 2015. Accessed: March 5, 2018. Available from: http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Dengue 2015.pdf
8. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del evento de dengue, Colombia, 2016. Accessed: March 5, 2018. Available from: http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Dengue 2016.pdf
9. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del evento dengue, Colombia, 2017. Accessed: March 5, 2018. Available from: http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/DENGUE PE XIII 2017.pdf
10. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del evento chikungunya, Colombia, 2015. Accessed: March 5, 2018. Available from: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe de Evento Epidemiolgico/CHIKUNGUNYA Periodo XIII 2015.pdf
11. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del evento chikungunya, Colombia, 2016. Accessed: March 5, 2018. Available from: http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Chikunguña 2016.pdf
12. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del evento Zika, Colombia - semanas epidemiológicas 32 de 2015 a 52 de 2016. Accessed: March 5, 2018. Available from: http://www.ins.gov.co/Noticias/ZIKA/Casos zika por municipio semana 52 2016.pdf
13. **World Health Organization.** Dengue, 2018. Accessed: March 5, 2018. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/
14. **Organización Panamerica de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** Resolución CD55.R6: Estrategia para la prevención y control de las enfermedades arbovirales, 2016. Accessed: March 5, 2018. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc
15. **Becker N, Zgomba M, Ludwig M, Petric D, Rettich F.** Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* treatments. J Am Mosq Control Assoc. 1992;8:285-9.

16. **De Barjac H.** Étude cytologique de l'action de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* sur larves de moustiques. Comptes Rendus de l'Académie des Sci. 1978;286:1629-32.

17. **Ponce G.** Efecto de concentraciones subletales de *Bacillus thuringiensis israelensis* H-14 Vectobac AS® en parámetros biológicos de *Ae. aegypti* (tesis). San Nicolás de los Garza, N.L., México: Universidad Autónoma de Nuevo León; 1999.

18. **Suárez M, Ayala W, Nelson M.** Evaluacion de dos formulaciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 para el control de larvas de *Aedes aegypti*. Biomédica. 1987;7:5-12. https://doi.org/10.7705/biomedica.v7i1-2.1928

19. **Gerberg E.** Manual for mosquito rearing and experimental techniques. Am Mosq Control Assoc. 1970;5:1-9.

20. **World Health Organization.** Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva: WHO; 2005.

21. **Cadavid JM.** Estructura genética microgeográfica y susceptibilidad a insecticidas de *Aedes aegypti* de Medellín. Medellín: Universidad de Antioquia; 2016. p. 79.

22. **Departamento Administrativo Nacional de Estadística.** Documento: Esquema de Ordenamiento Territorial. Municipio de San Carlos, Córdoba: DANE; 2005.

23. **Mulla MS, Norland LR, Fanara DM, Darwazeh HA, McKean DW.** Control of chironomid midges in recreational lakes. J Econ Entomol. 1971;64:300-7.

24. **Ocampo CB, González C, Morales CA, Pérez M, Wesson D, Apperson CS.** Evaluation of community-based strategies for *Aedes aegypti* control inside houses. Biomédica. 2009;29: 282-97. https://doi.org//S0120-41572009000200020

25. **Marcombe S, Darriet F, Agnew P, Etienne M, Yp-Tcha MM, Yébakima A, *et al*.** Field efficacy of new larvicide products for control of multi-resistant *Aedes aegypti* populations in Martinique (French West Indies). Am J Trop Med Hyg. 2011;84:118-26.

26. **World Health Organization.** *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in drinking-water. Geneva: World Health Organization; 2009. p. 8.

27. **Instituto Nacional de Salud.** Informe epidemiológico: Red de vigilancia de la resistencia a insecticidas de uso en salud pública en Colombia 2004-2014. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2014. p. 27.

28. **Maestre R, Rey G, de las Salas J, Vergara C, Santacoloma L, Goenaga S, *et al*.** Estado de la susceptibilidad de *Aedes aegypti* a insecticidas en Atlántico (Colombia). Rev Colomb Entomol. 2010;36:242-8.

29. **Conde M, Orjuela LI, Castellanos CA, Herrera-Varela M, Licastro S, Quiñones ML.** Evaluación de la sensibilidad a insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Caldas, Colombia, en 2007 y 2011. Biomédica. 2014;35:43-52. https://doi.org//10.7705/biomedica.v35i1.23

30. **Maestre R, Rey G, de las Salas J, Vergara C, Santacoloma L, Goenaga S, *et al*.** Susceptibilidad de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) a temefos en Atlántico-Colombia. Rev Colomb Entomol. 2009;35:202-5.

31. **Vilarinhos P, Monnerat R.** Larvicidal persistence of formulations of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* to control larval *Aedes aegypti*. J Am Mosq Control Assoc. 2004;20:311-4.

32. **Zequi JAC, Lopes J, Santos FP.** Efficacy and persistence of two *Bacillus thuringiensis israelensis* formulations for the control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) under simulated field conditions. Int J Mosq Res. 2015;2:5-9.

33. **Melo-Santos MAV de, Gomes Sanchez E, de Jesus FJ, Regis L.** Evaluation of a new tablet formulation based on *Bacillus thuringiensis sorovar. israelensis* for larvicidal control of *Aedes aegypti*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96:859-60.

34. **Boyce R, Lenhart A, Kroeger A, Velayudhan R, Roberts B, Horstick O.** *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: Systematic literature review. Trop Med Int Heal. 2013;18:564-577. https://doi.org//10.1111/tmi.12087

35. **Becker N, Djakaria S, Kaiser A, Zulhasril O, Ludwig HW.** Efficacy of a new tablet formulation of an asporogenous strain of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larvae of *Aedes aegypti*. Bull Soc Vector Ecol. 1991;16:176-82.

36. **Armengol G, Hernández J, Vélez JG, Orduz S.** Long-lasting effects of a *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* experimental tablet formulation for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) control. J Econ Entomol. 2006;99:1590-1595. https://doi.org//10.1093/jee/99.5.1590

37. **Mahilum MM, Ludwig M, Madon MB, Becker N.** Evaluation of the present dengue situation and control strategies against *Aedes aegypti* in Cebu City, Philippines. J vector Ecol. 2005;30:277-83.

38. **Mulla MS, Thavara U, Tawatsin A, Chompoosri J.** Procedures for evaluation of field efficacy of slow-release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water-storage containers. J Am Mosq Control Assoc. 2004;20: 64-73.

39. **Benjamin S, Rath A, Chiang YF, Lee HL.** Efficacy of a *Bacillus thuringiensis israelensis* tablet formulation, VectoBac DT®, for control of dengue mosquito vectors in potable water containers. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005;36:879-92.

40. **Monnerat R, Dumas V, Ramos F, Pimentel L, Nunes A, Sujii E, *et al*.** Evaluation of different larvicides for the control of *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) under simulated field conditions. BioAssay. 2012;7:1-4.

41. **Tetreau G, Stalinski R, Kersusan D, Veyrenc S, David JP, Reynaud S, *et al*.** Decreased toxicity of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* to mosquito larvae after contact with leaf litter. Appl Environ Microbiol. 2012;78:5189-95. https://doi.org//10.1128/AEM.00903-12

42. **Ben-Dov E, Saxena D, Wang Q, Manasherob R, Boussiba S, Zaritsky A.** Ingested particles reduce susceptibility of insect larvae to *Bacillus thuringiensis*. J Appl Entomol. 2003; 127:146-52. https://doi.org//10.1046/j.1439–0418.2003

43. **Kroeger A, Dehlinger U, Burkhardt G, Atehortua W, Anaya H, Becker N.** Community based dengue control in Columbia: People's knowledge and practice and the potential contribution of the biological larvicide Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*). Trop Med Parasitol. 1995;46: 241-6.

44. **Phan-Urai P, Kong-ngamsuk W, Malainual N.** Field trial of *Bacillus thuringiensis* H-14 (Larvitab®) against *Aedes aegypti* larvae in Amphoe Khlung, Chanthaburi Province, Thailand. J Trop Med Parasitol. 1995;18:106-14.

45. **Batra CP, Mittal PK, Adak T.** Control of *Aedes aegypti* breeding in desert coolers and tires by use of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* formulation. J Am Mosq Control Assoc. 2000;16:321-3.

46. **Setha T, Chantha N, Socheat D, Benjamin S.** Efficacy of VectoBac WG, a *Bacillus thuringiensis israelensis* formulation, to control dengue mosquito vectors in Cambodia. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:256-7.

47. **Ortegó n-Cárdenas L, Carvajal-López D.** Efectividad del *Bacillus thuringiensis israelensis* como control biológico para larvas de *Aedes aegypti* en Florencia (Caquetá, Colombia). Momentos Cienc. 2009;6:100-4.

48. **Ponce G, Flores AE, Badii MH, Fernández I, Rodríguez ML.** Evaluación de *Bacillus thuringiensis isaraelensis* (VectoBac 12 ASâ) sobre la población larval de *Aedes aegypti* en el área metropolitana de Monterrey N. L. México. Rev la Fac Salud Pública y Nutr Univ Autónoma León. 2003;4:3-9.

49. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.** La estrategia de gestión integrada para la prevención y el control del dengue en la Región de las Américas. Washington, D.C.: OPS/OMS; 2017. p. 70.

Biomédica 2018;38:106-16
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3957

ARTÍCULO ORIGINAL

Conocimientos, prácticas y aspectos entomológicos del dengue en Medellín, Colombia: un estudio comparativo entre barrios con alta y baja incidencia

Celeny Ortiz[1], Guillermo L. Rúa-Uribe[1], Carlos A. Rojas[2]

[1] Grupo de Entomología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[2] Grupo de Epidemiología, Facultad Nacional de Salud Pública, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. El dengue, transmitido principalmente por *Aedes aegypti,* es una enfermedad viral de gran importancia en salud pública. Colombia es un país endemoepidémico para el dengue y, en ciudades como Medellín, hay barrios con alta y baja incidencia. Las diferencias en cuanto a los conocimientos, las prácticas y los aspectos entomológicos podrían estar determinando la dinámica de la enfermedad en los barrios.
Objetivo. Determinar los conocimientos y prácticas en torno al dengue de los habitantes de barrios con alta y baja incidencia y explorar los aspectos entomológicos relacionados con la presencia del vector.
Materiales y métodos. Se hizo un estudio transversal y se compararon dos barrios con alta incidencia y dos con baja incidencia durante el trienio de 2013 a 2015. Se seleccionó una muestra aleatoria de 100 viviendas por barrio para evaluar los conocimientos, las prácticas y los aspectos entomológicos. Se hicieron el análisis descriptivo, el bivariado y el multivariado (regresión logística).
Resultados. En los barrios con alta incidencia, los participantes se caracterizaron por no haber realizado estudios o haber cursado únicamente primaria (*odds ratio*, OR=1,69; $IC_{95\%}$=1,09-2,63), así como por pertenecer al régimen subsidiado del sistema de seguridad social en salud o no estar afiliado (OR=2,16; $IC_{95\%}$ 1,41-3,32) y, además, presentaron un mayor conocimiento del vector (OR=1,53; $IC_{95\%}$ 1,00-2,35). En cuanto a las prácticas, la posibilidad de encontrar viviendas en donde se almacenaba el agua fue mayor (OR=1,69; $IC_{95\%}$ 1,11-2,57) y, en lo relacionado con los aspectos entomológicos, se encontraron más viviendas con mosquitos adultos (OR=2,13; $IC_{95\%}$ 1,29-3,50).
Conclusiones. En este estudio se encontraron diferencias importantes entre los barrios en cuanto a los conocimientos, las prácticas y la presencia de estados adultos del vector, lo cual contribuye a explicar la epidemiología del dengue en estos lugares.

Palabras clave: *Aedes*; dengue; conocimientos, actitudes y práctica en salud; factores de riesgo; entomología; epidemiología.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3957

Knowledge, practices and entomological aspects of dengue in Medellín, Colombia: A comparative study of neighborhoods with high and low incidence

Introduction: Dengue, mainly transmitted by *Aedes aegypti,* is a very important viral disease in terms of public health. Colombia is an endemoepidemic country for dengue and, in cities like Medellín, there are neighborhoods with high and low incidence. The disease dynamics in the neighborhoods might be determined by differences in the knowledge, practices and entomological aspects of the vector among the communities.
Objective: To identify the knowledge and practices of residents of neighborhoods with high and low incidence of dengue, and to explore the entomological aspects related to the presence of the vector.
Materials and methods: We conducted a cross-sectional study comparing two neighborhoods with high incidence and two with low incidence during the triennium of 2013-2015. A random sample of 100 houses per neighborhood was selected in order to evaluate the knowledge, practices and entomological aspects related to dengue. In addition, descriptive, bivariate and multivariate analyses (logistic regression) were performed.
Results: In neighborhoods with high incidence, participants had not attended school or had only a primary school level of education (OR=1.69; 95% CI: 1.09-2.63). Additionally, they did not have health coverage or belonged to the subsidized regime (OR=2.16; 95% CI: 1.41-3.32). In contrast, they

Contribución de los autores:
Celeny Ortiz: desarrollo de la idea, diseño del estudio, recolección, tabulación e interpretación de los datos
Guillermo L. Rúa-Uribe: seguimiento del proceso investigativo y análisis de resultados
Carlos A. Rojas: diseño del estudio y análisis de resultados
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

had a greater knowledge of the vector (OR=1.53; 95% CI: 1.00-2.35). In terms of practices, there was a greater chance of finding houses where water was stored (OR=1.69; 95% CI: 1.11-2.57) and regarding the entomological aspects, more houses with adult mosquitoes were found (OR=2.13 95% CI: 1.29-3.50).

Conclusions: We found important differences among the neighborhoods regarding knowledge, practices, and the presence of adult stages of the vector, which helps to explain the epidemiology of dengue in these sites.

Key words: *Aedes*; dengue; health knowledge, attitudes, practice; risk factors; entomology; epidemiology.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3957

El dengue es una enfermedad vectorial de gran importancia en salud pública, con una alta tasa de la enfermedad en diferentes regiones del mundo (1). Se ha estimado que 390 millones de infecciones por dengue ocurren cada año ($IC_{95\%}$ 284-528), de las cuales 96 millones ($IC_{95\%}$ 67-136) tienen algún nivel de gravedad clínica o subclínica (2).

La infección se transmite a los seres humanos por la picadura de mosquitos del género *Aedes,* principalmente *Aedes aegypti* y *A. albopictus* (3). Esta enfermedad presenta una amplia distribución a nivel mundial, especialmente en zonas tropicales y subtropicales (1). En Colombia, la presencia de la enfermedad en los últimos años se ha intensificado y, aproximadamente, 25 millones de personas de las áreas urbanas están en riesgo de contraerla (4).

Medellín es una de las ciudades colombianas clasificadas como hiperendémica para el dengue, dado que ha habido un registro constante de casos en los últimos cinco años, con una tendencia al incremento; además, circulan los cuatro serotipos del virus, el número de personas afectadas menores de 15 años ha aumentado y se reportan casos de dengue grave (5). En el 2016, ocurrió en la ciudad una epidemia comparable con la del 2010, en la cual se reportaron algo más de 17.000 casos de dengue (6). Sin embargo, la dinámica de la transmisión de la infección en la ciudad es heterogénea dependiendo de los barrios, pues los factores que influyen en su incidencia divergen (7), lo que configura situaciones epidemiológicas dinámicas, como ocurre en otras ciudades hiperendémicas (8-11).

Los factores involucrados en la transmisión son de tipo social, entomológico, ecológico, político y económico, y su interacción favorece la presencia del vector en un determinado contexto geográfico como el barrio, donde las personas podrían tener una mayor exposición al virus (12-15).

Entre los factores sociales, los conocimientos sobre el dengue podrían influir en prácticas como el almacenamiento de agua y el abandonar objetos a la intemperie (llantas, ollas y vasijas) que pueden convertirse en depósitos de agua lluvia y en sitios de cría del vector. Debe anotarse, sin embargo, que diversos autores han señalado que no existe una relación directa entre los conocimientos y la práctica.

En cuanto a los factores entomológicos en los barrios, la densidad vectorial, la disponibilidad y la distribución de los sitios de cría y los hábitos alimenticios, son elementos clave que pueden configurar situaciones espaciales heterogéneas para la transmisión del virus del dengue (13,15).

En este sentido, el determinar cuáles son los conocimientos y las prácticas de la población, así como los aspectos entomológicos, es esencial para comprender la epidemiología del dengue en los diferentes espacios geográficos y diseñar intervenciones de control adaptadas a la comunidad (16). Es importante que los programas de prevención del dengue tengan en cuenta los conocimientos y las prácticas de la comunidad, con el fin de fomentar su participación en la adecuada eliminación de potenciales sitios de cría del vector (17).

En este contexto, el propósito del presente estudio fue determinar cuáles son los conocimientos y las prácticas de los habitantes de barrios con alta y baja incidencia de dengue, así como explorar los aspectos entomológicos relacionados con la presencia del vector.

Materiales y métodos

Área de estudio

Medellín, capital del departamento de Antioquia, se extiende longitudinalmente sobre el eje natural del río que lleva su nombre. Su altitud promedio

Correspondencia:
Celeny Ortiz, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Carrera 51D N° 62-29, laboratorio 321, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 219 6061
celeortizrpo@gmail.com

Recibido: 30/05/17; aceptado: 31/05/18

es de 1.479 msnm, su temperatura, de 24 °C y la precipitación anual, de 1.656 mm (18). Este entorno climático es favorable para la presencia y la supervivenciaa de *A. aegypti* y *A. albopictus,* así como para la transmisión de virus como el dengue, el Zika y el chikungunya (19). El dengue puede afectar a casi toda la población de la ciudad, estimada en el 2015 en 2'464.322 habitantes, los cuales se ubican en 16 comunas urbanas, 249 barrios y cinco corregimientos (20).

Selección de los barrios. Inicialmente se analizó la incidencia del dengue entre 2013 y 2015, ajustada mediante el método indirecto (no se presntan estos resultados). Posteriormente, se seleccionaron aleatoriamente dos barrios con alta incidencia y dos con baja incidencia. Los barrios con alta incidencia se definieron como aquellos cuya razón de morbilidad estandarizada tenía un valor superior a 100 una vez ajustada la incidencia, lo cual indicaba que la incidencia del dengue en dicho barrio era mayor comparada con la que se presentaría en toda la ciudad, en tanto que los barrios con baja incidencia fueron aquellos con valores de razón de morbilidad estandarizada inferiores a 100.

Los barrios con alta incidencia seleccionados fueron Nuevos Conquistadores y La Salle, y aquellos con baja incidencia, La Milagrosa y Francisco Antonio Zea, los cuales se ubican en diferentes puntos cardinales de la ciudad.

Selección de viviendas para encuestar. Se hizo un muestreo por conglomerados, polietápico y sistemático, empleando un mapa para seleccionar aleatoriamente trece manzanas por barrio. Posteriormente, se dio inicio a las encuestas ubicando la vivienda situada en una de las cuatro esquinas de cada una de las manzanas seleccionadas y, a partir de allí, se seleccionó la segunda vivienda cada seis viviendas siguiendo el sentido de las manecillas del reloj y, así sucesivamente, hasta recorrer toda la manzana, para luego continuar con las siguientes manzanas. Se seleccionaron 400 viviendas para encuestar (100 por barrio).

Tipo de estudio

Se hizo un estudio transversal entre julio y septiembre del 2016. Se entrevistó a una sola persona mayor de edad por casa, sin importar su sexo, la cual debía haber residido en el barrio durante los tres años anteriores. Se excluyeron aquellas personas con alguna enfermedad u otra condición que les impidiera responder de forma autónoma la encuesta.

Fuentes de datos

Conocimientos y prácticas. Se diseñó un cuestionario con base en el facilitado por Quintero, *et al.* (21), el cual se aplicó mediante entrevista cara a cara; las opciones de respuesta se leían a las personas y estas seleccionaban la respuesta.

El cuestionario se dividió en cinco secciones de la siguiente forma: 1) información del encuestado, 2) características de las viviendas y servicios básicos, 3) conocimientos del vector, 4) conocimientos de la enfermedad y 5) prácticas relacionadas con el dengue.

Antes de la entrevista, se hicieron diez encuestas en uno de los cuatro barrios, seleccionado aleatoriamente (La Salle), para evaluar mediante una prueba piloto la formulación y la coherencia de las preguntas. Posteriormente, se hicieron los ajustes pertinentes y se reformularon algunas preguntas para su mejor comprensión por parte de la comunidad. Dado que el estrato socioeconómico de los habitantes del barrio seleccionado era similar al de los otros, se previó que el lenguaje de las preguntas sería comprensible para todos los encuestados.

Características entomológicas

La información entomológica se obtuvo mediante la inspección de la vivienda después de la encuesta de conocimientos y prácticas, con el fin de detectar los sitios de cría del vector, la cantidad de pupas y la presencia de mosquitos adultos. En cada vivienda se emplearon 30 minutos, aproximadamente, para el muestreo entomológico. Se tuvieron en cuenta los depósitos con agua, accesibles y no accesibles, tanto bajo techo como a la intemperie, y se determinaron como sitios de cría del vector aquellos depósitos en los que se encontraran estados inmaduros posteriormente identificados como *Aedes* en el laboratorio, según la clave pictórica de Rueda (22).

Las pupas se contaron en cada recipiente y se aplicó la metodología propuesta por Romero-Vivas, *et al.,* según las dimensiones del depósito (23). Los mosquitos adultos se capturaron en reposo utilizando jama y aspirador entomológico y se identificaron empleando la clave pictórica de Rueda (22). Las viviendas seleccionadas se visitaron entre las 9:00 am y las 4:00 pm, horario que se consideró como el más cómodo para los participantes.

Análisis de los datos

Conocimientos y prácticas. Para analizar la información, se construyeron variables de resumen:

para los conocimientos sobre el vector, la transmisión y la enfermedad, y para las prácticas de almacenamiento de agua (presencia de canecas, plantas, tanques bajos o depósitos al aire libre con agua), evaluadas mediante la inspección visual y la encuesta.

Se consideró que el encuestado tenía conocimientos sobre el vector cuando respondía acertadamente por lo menos dos de las siguientes tres preguntas: ¿En dónde se crían los zancudos?, ¿Alguna vez ha visto las larvas del vector? y ¿Cómo se relacionan las larvas con el dengue?

En cuanto a la transmisión, se consideró que la persona tenía conocimientos sobre esta cuando respondía acertadamente las siguientes dos preguntas: ¿Cómo le puede dar a una persona dengue? y ¿Cómo podría usted enfermarse si un vecino tiene dengue?

Por último, para el caso del conocimiento de los síntomas, se consideró que el encuestado los conocía cuando mencionaba la fiebre y dos o más de los siguientes: cefalea, náuseas, vómito, mialgias, artralgias, dolor abdominal, dolor retroorbital, diarrea, erupción cutánea o sangrados.

Características entomológicas. Con la información obtenida del muestreo entomológico, se calcularon los siguientes indicadores: 1) número de viviendas con presencia de estados inmaduros o de mosquitos adultos, 2) número de depósitos con estados inmaduros, 3) índice de Breteau (número de depósitos con estados inmaduros / número de viviendas inspeccionadas * 100), y 4) índice de pupas por vivienda (número de pupas / número de viviendas inspeccionadas * 100).

Se empleó el análisis univariado para la información sociodemográfica (sexo, edad, ocupación, régimen de salud y nivel educativo), los conocimientos del vector, la transmisión y los síntomas de la enfermedad, las prácticas de almacenamiento de agua y los aspectos entomológicos. Además, con el propósito de comparar las proporciones entre los barrios con alta y baja incidencia, se aplicó la prueba de ji al cuadrado de Pearson y se calcularon las *odds ratio* (OR) con los respectivos intervalos de confianza de 95 % ($IC_{95\%}$).

Con dicha información, se construyó un modelo explicativo para identificar las variables que caracterizaban a los barrios con alta y baja incidencia de dengue, y mediante un modelo de regresión logística, se establecieron las OR ajustadas. Las variables ingresadas en el modelo fueron aquellas que presentaron un valor de p menor de 0,25 en la prueba de ji al cuadrado en el análisis bivariado; asimismo, se verificó que no existiera interacción entre dos o más variables. En el análisis bivariado y en el multivariado, se utilizó un nivel de significación de 5 %. Los diferentes análisis se hicieron con el programa SPSS Statistics™, versión 21.

Consideraciones éticas

El estudio contó con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación de la Facultad Nacional de Salud Pública de la Universidad de Antioquia (Acta N° 139 del 15 de abril de 2016). Además, se empleó un consentimiento informado en el cual se explicaron los objetivos del estudio y los procedimientos, así como los riesgos, beneficios y compromisos del participante.

Resultados

Características sociodemográficas de los participantes

Debido a las dificultades logísticas en el barrio Nuevos Conquistadores, de los 100 participantes que se consideró incluir en el estudio, solo fue posible encuestar a 99. En los demás barrios se hicieron las 100 encuestas previstas.

Tanto en los barrios de alta incidencia como en los de baja incidencia, más del 75 % de los participantes correspondió a mujeres, y más del 60 % era mayor de 44 años; en cuanto al sexo (χ^2=2,32; gl=1; p=0,128) y la edad (χ^2=7,40; gl=3; p=0,065), no se encontraron diferencias significativas entre los barrios. Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticas entre los barrios con respecto a la ocupación (χ^2=24,38; gl=5; p<0,001), siendo el oficio de “ama de casa” el más frecuente, seguido de “trabajador independiente” o “empleado” (cuadro 1).

En los barrios con alta incidencia, cerca del 50 % de los encuestados estaba afiliado al régimen subsidiado de salud, en tanto que, en aquellos con baja incidencia, alrededor del 30 % estaba afiliado a este mismo régimen, y 60 % al régimen contributivo (cuadro 1).

Con respecto al nivel educativo, en los barrios con alta incidencia, aproximadamente, el 70 % de los participantes no había recibido ninguna formación o solo había cursado la primaria, en tanto que el 30 % tenía formación secundaria o superior. Según el análisis estadístico, en los barrios de baja incidencia, los participantes mostraron un mayor nivel de educación (χ^2=25,27; gl=3; p<0,001) (cuadro 1).

Cuadro 1. Características sociodemográficas de los participantes en los barrios con alta incidencia (Nuevos Conquistadores y La Salle) y baja incidencia (La Milagrosa y Francisco Antonio Zea) de dengue seleccionados en Medellín

Variables	Incidencia de dengue						χ^2	p†
	Alta			Baja				
	A1 (n=99)	A2 (n=100)	Total n (%)	B1 (n=100)	B2 (n=100)	Total n (%)		
Sexo								
Mujer	85	84	169 (84,9)	77	80	157 (78,5)	2,32 (gl=1)	0,128
Hombre	14	16	30 (15,1)	23	20	43 (21,5)		
Edad (años)								
18-29	22	15	37 (18,6)	9	12	21 (10,5)	7,40 (gl=3)	0,060
30-44	18	21	39 (19,6)	15	17	32 (16,0)		
45-59	26	32	58 (29,1)	37	36	73 (36,5)		
>59	33	32	65 (32,7)	39	35	74 (37,0)		
Ocupación								
Ama de casa	73	66	139 (69,8)	57	56	113 (56,5)	24,38 (gl=5)	<0,001
Empleado	10	7	17 (8,5)	10	12	22 (11,0)		
Trabajador independiente	7	11	18 (9,0)	14	14	28 (14,0)		
Desempleado	5	6	11 (5,5)	5	8	13 (6,5)		
Estudiante	4	8	12 (6,0)	3	1	4 (2,0)		
Pensionado	0	2	2 (1,0)	11	9	20 (10,0)		
Régimen de salud								
Contributivo	45	52	97 (48,7)	76	57	133 (66,5)	19,34 (gl=2)	<0,001
Subsidiado	53	46	99 (49,7)	19	39	58 (29,0)		
No afiliado	1	2	3 (1,51)	5	4	9 (4,5)		
Nivel educativo								
Ninguno	34	32	66 (33,2)	7	20	27 (13,5)	25,27 (gl=3)	<0,001
Primaria	43	26	69 (34,7)	45	36	81 (40,5)		
Secundaria	19	34	53 (26,6)	33	32	65 (32,5)		
Superior	3	8	11 (5,5)	15	12	27 (13,5)		

A1: barrio Nuevos Conquistadores; A2: barrio La Salle; B1: barrio La Milagrosa; B2: barrio Francisco Antonio Zea; † Mediante la prueba de ji al cuadrado (χ^2) de Pearson se compararon los valores del total del barrio según la incidencia; gl: grados de libertad

Conocimientos sobre el vector, la transmisión y los síntomas

Cerca del 50 % de los participantes en los dos tipos de barrios tenía un conocimiento adecuado del vector, pues identificaron correctamente los sitios de cría y la relación de las larvas con el mosquito adulto (cuadro 2).

La situación fue similar en cuanto a los conocimientos sobre la transmisión y los síntomas. Los resultados de la prueba de ji al cuadrado evidenciaron que el conocimiento del vector de los habitantes de todos los barrios era similar (χ^2=1,57; gl=1; p=0,210), al igual que los relacionados con la transmisión (χ^2=2,19; gl=1; p=0,139) y los síntomas (χ^2=0,07; gl=1; p=0,789) (cuadro 2).

En cuanto a los síntomas mencionados por los participantes de todos los barrios seleccionados, los más comunes fueron fiebre, cefalea, mialgias y artralgias. En cambio, signos como sangrado, erupción cutánea y dolor abdominal, se mencionaron con menor frecuencia (figura 1).

Prácticas relacionadas con la prevención del dengue

Cuando se indagó por las prácticas de los participantes para prevenir el dengue, se encontró que cerca del 50 % de los participantes en cada barrio señaló no tener aguas estancadas en la vivienda como una medida eficaz de control. Sin embargo, prácticas como cambiar el agua cada semana y tapar los recipientes, se mencionaron con menor frecuencia en los dos tipos de barrios.

En cuanto a la inspección de la vivienda para verificar las prácticas relacionadas con los depósitos con agua, hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los barrios con alta y baja incidencia, pues en los primeros se registró un 76 % más de posibilidad de almacenar agua en canecas y tanques bajos con fines domésticos (χ^2=7,77; gl=1; p=0,005) (cuadro 3).

En cuanto a la procedencia del agua almacenada en canecas y tanques bajos, esta provenía principalmente del servicio de acueducto, seguido de

Cuadro 2. Conocimientos de los participantes sobre el vector, la transmisión y los síntomas del dengue en los barrios con alta incidencia (Nuevos Conquistadores y La Salle) y baja incidencia (La Milagrosa y Francisco Antonio Zea) de dengue seleccionados en Medellín

Conocimientos	Incidencia de dengue		χ^2 (gl=1)	p	OR	$IC_{95\%}$
	Alta n (%)	Baja n (%)				
Vector						
Sí	107 (53,7)	95 (47,5)	1,57	0,210	1,28	0,87-1,90
No	92 (46,3)	105 (52,5)				
Transmisión						
Sí	76 (38,2)	91 (45,5)	2,19	0,139	0,74	0,49-1,10
No	123 (61,8)	109 (54,5)				
Síntomas						
Sí	123 (61,8)	121 (60,5)	0,07	0,789	1,05	0,69-1,55
No	76 (38,2)	79 (39,5)				

gl: grados de libertad

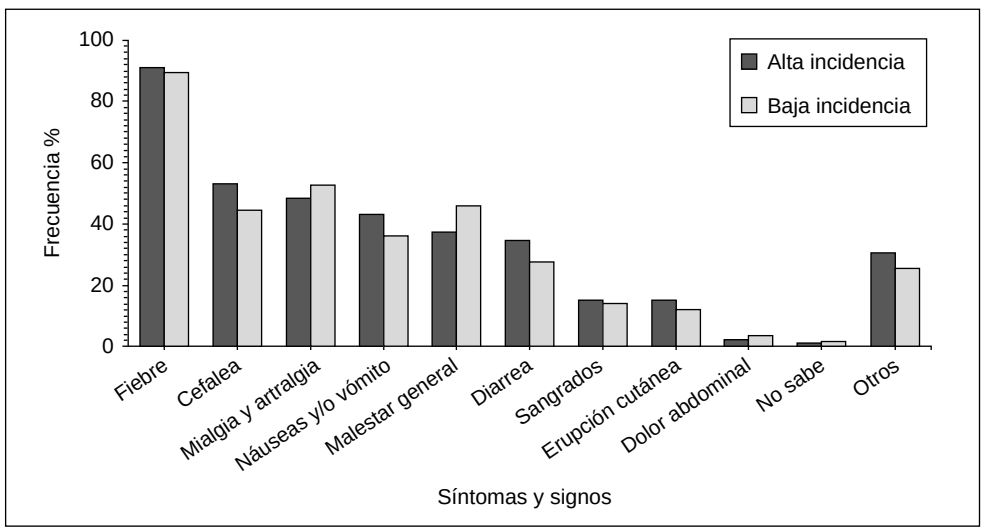

Figura 1. Síntomas y signos del dengue reconocidos por los participantes en los barrios seleccionados

la recolección de aguas lluvias y la reutilización del agua del lavado de la ropa en la lavadora.

Aspectos entomológicos

Se inspeccionaron 639 depósitos con agua, 333 (52,1 %) en los barrios de alta incidencia y 306 (47,9 %) en los de baja incidencia. En cerca del 10 % de los depósitos inspeccionados, se encontraron estados inmaduros (larvas o pupas) y no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los barrios (χ^2=2,29; gl=1; p=0,131) (cuadro 4).

En el 10 % de las viviendas, aproximadamente, se hallaron estados inmaduros y, al comparar los barrios de alta incidencia con los de baja, no hubo diferencias estadísticamente significativas (χ^2=0,89; gl=1; p=0,346) (cuadro 4). Sin embargo, en los barrios de alta incidencia hubo más viviendas con estados adultos del vector, lo cual fue estadísticamente significativo (χ^2=9,57; gl=1; p=0,002); según la OR (2,10; $IC_{95\%}$ 1,30-3,39), en estos barrios había una mayor posibilidad de encontrar viviendas con mosquitos adultos (cuadro 4).

El índice de Breteau evidenció una mayor cantidad de viviendas con sitios de cría en los barrios de alta incidencia (21,6 %) en comparación con los de baja incidencia (14,0 %). En cuanto al índice de pupas, también la frecuencia fue mayor en los barrios con alta incidencia (39,7 %), a pesar de que se excluyó un dato atípico en una vivienda del barrio Nuevos Conquistadores, en donde se recolectaron más de 200 pupas en un solo tipo de criadero (tanque bajo). En los barrios de baja incidencia el índice de pupas fue de 10 %.

Cuadro 3. Prácticas favorecedoras de los participantes de la presencia del vector en los barrios con alta incidencia (Nuevos Conquistadores y La Salle) y baja incidencia (La Milagrosa y Francisco Antonio Zea) de dengue seleccionados en Medellín

Prácticas	Incidencia de dengue		χ^2 (gl=1)	p	OR	$IC_{95\%}$
	Alta n (%)	Baja n (%)				
Almacenamiento de agua en canecas y tanques bajos						
Sí	127 (63,8)	100 (50)	7,77	0,005	1,76	1,18-2,63
No	72 (36,2)	100 (50)				
Plantas en agua						
Sí	39 (19,6)	43 (21,5)	0,22	0,638	0,89	0,54-1,44
No	160 (80,4)	157 (78,5)				
Depositos al aire libre con agua						
Sí	6 (3,0)	7 (3,5)	0,07	0,785	0,85	0,28-2,59
No	193 (97,0)	193 (96,5)				

gl: grados de libertad

Cuadro 4. Información entomológica de los vectores hallados en las viviendas en los barrios con alta incidencia (Nuevos Conquistadores y La Salle) y baja incidencia (La Milagrosa y Francisco Antonio Zea) de dengue seleccionados en Medellín

Aspectos entomológicos	Incidencia de dengue		χ^2 (gl=1)	p	OR	$IC_{95\%}$
	Alta n (%)	Baja n (%)				
Depósitos con estados inmaduros†	43 (12,9)	28 (9,1)	2,29	0,131	1,59	0,95-2,68
Viviendas con estados inmaduros‡	27 (13,6)	21 (10,5)	0,89	0,346	1,33	0,72-2,45
Viviendas con estados adultos‡	60 (30,1)	34 (17,0)	9,57	0,002	2,10	1,30-3,39

† Denominador para el cálculo: alta incidencia, 333 depósitos, y baja incidencia, 306
‡ Denominador para el cálculo: 199 viviendas en barrios con alta incidencia y 200 en los de baja incidencia
gl: grados de libertad

Modelo multivariado de las variables características de los barrios con alta incidencia

De las diez variables evaluadas en el modelo de regresión logística multivariado, solo cinco resultaron estadísticamente significativas: dos relacionadas con los factores sociodemográficos, una con los conocimientos, una con las prácticas y una con los aspectos entomológicos. De las variables sociodemográficas, el no tener ningún nivel educativo o solo la primaria (OR=1,69; $IC_{95\%}$: 1,09-2,63) y pertenecer al régimen subsidiado (OR=2,16; $IC_{95\%}$: 1,41-3,32), se asociaron significativamente con vivir en un barrio de alta incidencia (cuadro 5).

En cuanto al conocimiento del vector, la OR en el análisis bivariado no fue estadísticamente significativa, sin embargo, al ajustarla por las demás variables, esta fue de 1,53 ($IC_{95\%}$: 1,00-2,35), es decir que en los barrios con alta incidencia los participantes tenían 53,0 % más conocimientos sobre el vector que en los de baja incidencia (cuadro 5).

En cuanto a las prácticas, el almacenamiento de agua en canecas y tanques bajos fue una variable estadísticamente significativa tanto en el análisis bivariado como en el multivariado: según la OR ajustada (1,69; $IC_{95\%}$: 1,11-2,57), hubo un 69 % más de posibilidades de encontrar viviendas con presencia de estos potenciales sitios de cría del vector en los barrios con alta incidencia (cuadro 5).

Como quinta variable estadísticamente significativa en el modelo multivariado según la OR ajustada (2,13; $IC_{95\%}$: 1,29-3,50), se observó un 113 % más de posibilidades de encontrar viviendas con mosquitos adultos en los barrios de alta incidencia de dengue (cuadro 5).

Discusión

Los resultados indican que los participantes de los barrios de mayor incidencia, comparados con los de baja incidencia, se caracterizaron por no ser escolarizados o tener solo la educación primaria y estar afiliados al régimen subsidiado de salud, o no estar afiliados, pero, a pesar de ello, tenían un mayor conocimiento sobre el vector aunque en sus viviendas se encontró con mayor frecuencia agua almacenada en canecas y tanques bajos. Asimismo, en estos barrios se presentaron los

Cuadro 5. Modelo multivariado de las variables características de los barrios con alta incidencia de dengue

Variables independientes	OR(a)*	$IC_{95\%}$		Prueba de Wald (gl=1)	p
		Inferior	Superior		
Nivel educativo					
Ninguno o primaria	1,69	1,09	2,63	5,61	0,018
Secundaria o superior	1				
Régimen de salud					
Subsidiado	2,16	1,41	3,32	12,66	<0,001
Contributivo	1				
Conocimiento del vector					
Sí	1,53	1,00	2,35	3,83	0,050
No	1				
Almacenamiento de agua en canecas y tanques bajos					
Sí	1,69	1,11	2,57	6,12	0,013
No	1				
Viviendas con estados adultos del vector					
Sí	2,13	1,29	3,50	8,87	0,003
No	1				

* Ajustada por sexo, edad, ocupación, régimen de salud, nivel educativo, conocimiento del vector, conocimiento de la transmisión, almacenamiento de agua en canecas y tanques bajos**,** depósitos tapados y viviendas con estados adultos
gl: grados de libertad

mayores índices de infestación del vector. Estos hallazgos indican que la incidencia de dengue en los barrios de alta incidencia podría explicarse por variables que favorecen la presencia del vector.

Cabe señalar que, en los barrios con un mayor reconocimiento del vector, era más frecuente el almacenamiento de agua. Una situación similar fue reportada por Koenraadt, *et al*., quienes encontraron que en Kamphaeng (Tailandia), en las viviendas de las personas con mayor conocimiento de los sitios de cría del vector, la presencia de potenciales sitios de cría era mayor, comparada con las de quienes no tenían dicho nivel de conocimiento. A manera de explicación, los autores plantearon que tal conocimiento lo adquirían al tener una gran cantidad de sitios de cría dentro de la vivienda (24). Por lo tanto, el tener conocimiento sobre los mosquitos y el dengue no llevaría a disminuir el hábito de almacenar agua (21,25).

En un estudio en Nepal, en las zonas donde había un mayor riesgo de dengue, los participantes que tenían los conocimientos adecuados observaban con menor frecuencia las prácticas de prevención, como eliminar las aguas estancadas, en comparación con quienes vivían en zonas de menor riesgo. Por otra parte, las personas con mejores niveles educativos tenían mejores prácticas (26).

La falta de educación es un factor que otros autores también han asociado con prácticas inadecuadas de prevención que favorecen la presencia del vector del dengue (21,25,27), y en otras investigaciones se la ha asociado con un menor conocimiento sobre la enfermedad (28,29).

La variable de los conocimientos sobre la transmisión del dengue se comportó de forma similar en los participantes de los diferentes barrios. En general, las personas sabían que el dengue es transmitido por un mosquito, lo cual coincide con otros estudios (30). Sin embargo, algunas personas no asociaban el vector con la enfermedad, lo cual fue evidente pues un gran porcentaje de participantes que reconocía el mosquito como el transmisor del dengue, señaló que la enfermedad podía transmitirse por contacto con una persona enferma. En otros estudios también se ha encontrado que, a pesar de que las personas tienen buenos conocimientos sobre el dengue, albergan conceptos erróneos sobre la enfermedad, lo que lleva a adoptar prácticas inadecuadas en la comunidad (17,27,31). Entre tales conceptos erróneos, Stewart-Ibarra, *et al.,* mencionaron que, aunque las personas sabían que el dengue es trasmitido por un mosquito, no estaban seguras de cómo se “contaminaban” los mosquitos con el dengue y si la enfermedad podía ser contagiosa (31).

El nivel de conocimientos sobre los síntomas en los diferentes barrios es comparable con lo hallado en otras investigaciones, en las cuales se ha reportado que las personas señalan frecuentemente la fiebre y la cefalea como los síntomas típicos

del dengue. Sin embargo, los signos específicos, como el sangrado o la erupción cutánea, se mencionan con menor frecuencia. El hecho de que las personas no reconozcan los signos que indican la gravedad, lleva a que el dengue sea confundido con otras enfermedades (24,26) y, además, disminuye la percepción de riesgo con respecto a la enfermedad (29,32-33). Quintero, *et al.*, observaron que síntomas como la fiebre y la cefalea eran reconocidos frecuentemente por la población y 76 % de los participantes mencionó que las hemorragias eran signo de gravedad (21). Este último resultado difiere del obtenido en el presente estudio, lo cual se explicaría por las características culturales de cada población estudiada.

A nivel de las prácticas, aproximadamente la mitad de los participantes informó que el no tener aguas estancadas era una medida de prevención del dengue en los diferentes barrios. Sin embargo, durante la visita, en más de la mitad de las viviendas se encontró agua almacenada, principalmente en los barrios con alta incidencia. Una situación similar fue reportada por Mayxay, *et al.*, en Pak Ngum (Vietnam), donde el 50,7 % de los participantes informó que cubrían los recipientes de almacenamiento de agua, pero cuando se hizo la inspección, los investigadores observaron que solo el 21,5 % de las jarras y el 10,2 % de los tanques estaban cubiertos (34). Estos resultados indican que, a pesar de tener conocimientos sobre cómo prevenir el dengue, este no se acompaña de las prácticas adecuadas.

Otros autores han concluido que no existe asociación entre el conocimiento y la práctica (17,21, 24,29). Sin embargo, hay estudios que concluyen que sí existe una relación entre el conocimiento y las prácticas adecuadas para la prevención del dengue (10,16,27).

La diversidad de resultados encontrados con respeto a si los conocimientos influyen o no en las prácticas, podría deberse a la falta de consenso que existe en la 'operacionalización' (sic) de las diferentes variables, pues en cada estudio difiere el alcance de los conceptos de conocimientos y prácticas en torno al dengue (10).

El almacenamiento de agua fue la práctica que se registró con mayor frecuencia en los barrios de alta incidencia; también, se encontró en ellos una mayor infestación con mosquitos. El almacenamiento de agua se ha asociado en otros estudios con la presencia del vector (24-25). Koenraadt, *et al.*, observaron que una mayor proporción de depósitos con agua aumentaba la probabilidad de encontrar viviendas infestadas con mosquitos adultos (24).

El almacenamiento de agua también se ha reportado en otros estudios en zonas de alta transmisión del dengue en Colombia, como es el caso de Girardot, zona en donde hay una elevada transmisión y los investigadores encontraron que el 82 % de las personas almacenaba agua en sus viviendas (21).

La falta de servicios básicos como el agua se ha considerado como un factor de riesgo del dengue, ya que ello lleva a las personas a almacenar agua con mayor frecuencia (4,33). En el presente estudio se encontró que el almacenamiento de agua en los barrios evaluados no se debía a la falta del servicio y que esta se almacenaba con fines domésticos y no tanto para el consumo humano. Esta situación también la han señalado otros autores; por ejemplo, Fuentes-Vallejo, *et al.*, encontraron que en Armenia y Arauca el almacenamiento de agua no estaba asociado con la falta del servicio o con fallas en este (9), lo cual indicaría que dicha práctica responde a dinámicas sociales de ahorro de dinero o de tradición cultural, y que las personas se han acostumbrado a hacerlo por temor a que se les suspenda el servicio (25).

A pesar de que no existe un consenso sobre la relación entre la densidad vectorial y un mayor número de casos, en este estudio se encontró una mayor infestación de *A. aegypti* en los barrios con alta incidencia comparados con aquellos de baja incidencia. Sin embargo, algunos autores, como Barbosa, *et al.,* concluyeron que las áreas con altos índices entomológicos no se asociaban con una incidencia elevada del dengue (35). No obstante, el hecho de no encontrar dichas asociaciones no significa que la abundancia del vector no represente un riesgo. Es necesario diseñar estudios estandarizados y protocolos de muestreo que consideren adecuadamente la heterogeneidad espacial y los indicadores entomológicos pertinentes para medir la abundancia del vector (36).

Un único sitio de cría fue representativo –el tanque bajo– en el conteo mediante el índice de pupas. En otros estudios, se han encontrado altos porcentajes de pupas en los tanques bajos, lo que, como se sabe, contribuye a la producción de mosquitos adultos (21).

Entre las limitaciones del estudio debe mencionarse el escaso número de barrios estudiados, lo cual impide generalizar los resultados a todos los

barrios de la ciudad. Asimismo, se encuestó una gran cantidad de mujeres, pues en el horario de muestreo (9:00 am y 4.00 pm), es más probable encontrar mujeres que hombres en las viviendas, lo cual representa una limitación, ya que los hombres pueden tener otros conocimientos sobre la enfermedad. En otras investigaciones en las que se ha encontrado la misma situación, se ha argumentado que las amas de casa son los mejores informantes, ya que son las encargadas del manejo y el aseo de la vivienda y, por lo tanto, son las principales responsables de las actividades de prevención del dengue (28,31).

Los resultados del estudio deben considerarse con cuidado pues, al tratarse de un estudio transversal, no fue posible establecer la temporalidad y la dinámica de las relaciones entre las variables, aspecto que también se ha descrito en otros estudios (26,28).

También, debe tenerse en cuenta que los datos sobre la incidencia del dengue que permitieron clasificar los barrios como de alta o baja incidencia se recolectaron entre el 2013 y el 2015, en tanto que las encuestas y los muestreos entomológicos se hicieron en el 2016. Este año fue hiperepidémico, por lo que la clasificación de los barrios según la incidencia pudo ser muy similar. Además, las campañas de control de la Secretaría de Salud de Medellín pudieron haber afectado la presencia de estados inmaduros y adultos en los barrios seleccionados, situación que se observó en el barrio La Milagrosa, de baja incidencia, ya que durante el muestreo entomológico hubo actividades contra los vectores allí y en los barrios vecinos.

En este estudio se encontraron diferencias importantes entre los barrios con alta y baja incidencia en cuanto a los conocimientos y las prácticas, así como a la presencia de mosquitos adultos del vector, las cuales ayudarían a explicar la epidemiología del dengue en estos lugares. Esta información es de gran relevancia para las autoridades de salud encargadas de la vigilancia, la prevención y el control del dengue en la ciudad.

Agradecimientos

Al Grupo de Epidemiología y al Grupo de Entomología Médica de la Universidad de Antioquia, por el apoyo en la realización del estudio. A la Secretaría de Salud de Medellín, por facilitar la información y por la colaboración logística durante los muestreos, y a la comunidad participante, ya que sin su apoyo esta investigación no habría sido posible.

Conflicto de intereses

Los autores manifestamos no tener ningún conflicto de intereses con respecto al manuscrito.

Financiación

El presente trabajo fue financiado por el Grupo de Epidemiología y el Grupo de Entomología Médica de la Universidad de Antioquia.

Referencias

1. **Organización Mundial de la Salud.** Dengue, guías para el diagnóstico, tratamiento prevención y control. La Paz (Bolivia), 2009. Fecha de consulta: 10 de abril de 2017. Disponible en: http://www.paho.org/hon/index.php?option=com_docman&view=download&alias=342-dengue-guia-para-el-diagnostico-tratamiento-prevencion-y-control&category_slug=enfermedades-transmisibles&Itemid=211
2. **Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, *et al*.** The global distribution and burden of dengue. Nature. 2013;496:504-7. https://doi.org/10.1038/nature12060
3. **Gubler DJ.** Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev. 1998;11:480-96.
4. **Padilla J, Rojas D, Sáenz-Gómez R.** Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Primera edición. Bogotá; 2012.
5. **Ministerio de Salud y de la Protección Social.** Prevención de enfermedades transmisibles. Dengue. Fecha de consulta: 23 de agosto de 2015. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Dengue%20-%20Municipios%20priorizados.jpg
6. **Secretaría de Salud de Medellín.** Sistema de Información para la Vigilancia en Salud Pública. Medellín: Secretaría de Salud de Medellín; 2015.
7. **Ortiz C, Rúa-Uribe GL, Suárez C, Mafla MA, Almanza R, dos Santos SL.** Distribución espacial de casos e incidencia de dengue: análisis de la situación para Medellín-Colombia. Revista Facultad Nacional de Salud Pública. 2013;31:329-37.
8. **Surachart K, Piyarat B, Pattamaporn K.** Ecologic and sociodemographic risk determinants for dengue transmission in urban areas in Thailand. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2012;2012:1-12. https://doi.org/10.1155/2012/907494
9. **Fuentes-Vallejo M, Higuera DR, García T, Alcalá LA, García D, Munévar DA, *et al*.** Territorial analysis of *Aedes aegypti* distribution in two Colombian cities: A choremátic and ecosystem approach. Cad Saúde Pública. 2015;31:517-30. https://doi.org/10.1590/0102-311x00057214
10. **Castro M, Sánchez L, Pérez D, Sebrango C, Shkedy Z, van der Stuyft P.** The relationship between economic status, knowledge on dengue, risk perceptions and practices. PLoS One. 2013;8:1-6. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081875
11. **van Benthem BH, Khantikul N, Panart K, Kessels PJ, Somboon P, Oskam L.** Knowledge and use of prevention measures related to dengue in northern Thailand. Trop Med Int Health. 2002;7:993-1000. https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2002.00950.x

12. **Guzmán MG, Kouri G.** Dengue: An update. Lancet Infect Dis. 2002;2:33-42. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00171-2

13. **Caprara A, Lima JW, Marinho AC, Calvasina PG, Landim LP, Sommerfeld J.** Irregular water supply, household usage and dengue: A bio-social study in the Brazilian Northeast. Cad Saúde Pública. 2009;25:125-36. https://doi.org/10.1590/S0102-311X2009001300012

14. **Tapia R, Betancourt M, Méndez J.** Dengue: An escalating public health problem in Latin America. Paediatr Int Child Health. 2012;32:14-7. https://doi.org/10.1179/2046904712Z.00000000046

15. **Arunachalam N, Tana S, Espino F, Kittayapong P, Abeyewickreme W, Wai KT, *et al*.** Eco-bio-social determinants of dengue vector breeding: A multi-country study in urban and periurban Asia. Bull World Health Organ. 2010;88:173-84. https://doi.org/10.2471/BLT.09.067892

16. **dos Santos SL, Cabral AC, Augusto LG.** Conhecimento, atitude e prática sobre dengue, seu vetor e ações de controle em uma comunidade urbana do Nordeste. Cien Saude Colet. 2011;16:1319-30. http://doi.org/10.1590/S1413-81232011000700066

17. **Alyousefi A, Abdul-Ghani R, Mahdy MA, Al-Eryani SM, Al-Mekhlafi AM, Raja YA.** A household-based survey of knowledge, attitudes and practices towards dengue fever among local urban communities in Taiz Governorate, Yemen. BMC Infect Dis. 2016;16:543-51. https://doi.org/10.1186/s12879-016-1895-2

18. **Alcaldía de Medellín.** Datos generales de la ciudad. Fecha de consulta: 2 de enero de 2016. Disponible en: https://www.medellin.gov.co/irj/portal/visitantes?NavigationTarget=navurl://77dfcedc6ca49e88aa8db85caa77ce82

19. **Rúa-Uribe G. L, Suárez-Acosta C, Rojo RA.** Implicaciones epidemiológicas de *Aedes albopictus* (Skuse) en Colombia. Revista Facultad Nacional de Salud Pública. 2012;30:328-37.

20. **Alcaldía de Medellín.** Proyecciones de población 2006 - 2015 - 2009. Fecha de consulta: 4 de abril de 2016. Disponible en: https://www.medellin.gov.co/irj/go/km/docs/wpccontent/Sites/Subportal%20del%20Ciudadano/Planeaci%C3%B3n%20Municipal/Secciones/Indicadores%20y%20Estad%C3%ADsticas/Documentos/Proyecciones%20de%20poblaci%C3%B3n%202005%20-%202015/0%20Libro%20Proyecciones%202006%20-%202015.pdf

21. **Quintero J, Carrasquilla G, Suárez R, González C, Olano VA.** An ecosystemic approach to evaluating ecological, socioeconomic and group dynamics affecting the prevalence of *Aedes aegypti* in two Colombian towns. Cad Saúde Pública. 2009;25:93-103. https://.doi.org/10.1590/S0102-311X2009001300009

22. **Rueda L.** Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. New Zealand: Magnolia; 2004. p. 60.

23. **Romero-Vivas CM, Llinás H, Falconar AK.** Three calibration factors, applied to a rapid sweeping method, can accurately estimate *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) pupal numbers in large water-storage containers at all temperatures at which dengue virus transmission occurs. J Med Entomol. 2007;44:930-7. https://doi.org/10.1093/jmedent/44.6.930

24. **Koenraadt CJ, Tuiten W, Sithiprasasna R, Kijchalao U, Jones JW, Scott TW.** Dengue knowledge and practices and their impact on *Aedes aegypti* populations in Kamphaeng Phet, Thailand. Am J Trop Med Hyg. 2006;74:692-700

25. **García-Betancourt T, Higuera-Mendieta DR, González-Uribe C, Cortés S, Quintero J.** Understanding water storage practices of urban residents of an endemic dengue area in Colombia: Perceptions, rationale and socio-demographic characteristics. PLoS One. 2015;10:1-19. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129054

26. **Dhimal M, Aryal KK, Dhimal ML, Gautam I, Singh SP, Bhusal CL, *et al*.** Knowledge, attitude and practice regarding dengue fever among the healthy population of highland and lowland communities in Central Nepal. PLoS One. 2004;9:1-15. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102028

27. **Naing C, Ren WY, Man CY, Fern KP, Qiqi C, Ning CN, *et al*.** Awareness of dengue and practice of dengue control among the semi-urban community: A cross sectional survey. J Community Health. 2011;36:1044-9. https://doi.org/10.1007/s10900-011-9407-1

28. **Higuera-Mendieta DR, Cortés-Corrales S, Quintero J, González-Uribe C.** KAP surveys and dengue control in Colombia: Disentangling the effect of sociodemographic factors using multiple correspondence analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:1-18. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005016

29. **Shuaib F, Todd D, Campbell-Stennett D, Ehiri J, Jolly PE.** Knowledge, attitudes and practices regarding dengue infection in Westmoreland, Jamaica. West Indian Med J. 2010;59:139-46.

30. **Alves AC, Fabbro AL, Passos AD, Carneiro AF, Jorge TM, Martinez EZ.** Knowledge and practices related to dengue and its vector: A community-based study from Southeast Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2016;49:222-6. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0240-2015

31. **Stewart-Ibarra AM, Luzadis VA, Borbor-Córdova MJ, Silva M, Ordóñez T, Beltrán- Ayala E, *et al*.** A social-ecological analysis of community perceptions of dengue fever and *Aedes aegypti* in Machala, Ecuador. BMC Public Health. 2014;14:1135-46. https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-1135

32. **Chuc S, Hurtado-Díaz M, Schilmann A, Riojas-Rodríguez H, Rangel H, Irina M, *et al*.** Condiciones locales de vulnerabilidad asociadas con dengue en dos comunidades de Morelos. Salud Pública Mex. 2013;55:170-8.

33. **Suárez R, González C, Carrasquilla G, Quintero J.** An ecosystem perspective in the socio-cultural evaluation of dengue in two Colombian towns. Cad Saúde Pública. 2009;25:104-14. https://doi.org/10.1590/S0102-311X200900130001

34. **Mayxay M, Cui W, Thammavong S, Khensakhou K, Vongxay V, Inthasoum L, *et al*.** Dengue in peri-urban Pak-Ngum district, Vientiane, capital of Laos: A community survey on knowledge, attitudes and practices. BMC Public Health. 2013;13:434-41. https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-434

35. **Barbosa GL, Donalísio MR, Stephan C, Lourenço RW, Andrade VR, Arduino M, *et al*.** Spatial distribution of the risk of dengue and the entomological indicators in Sumaré, State of São Paulo, Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:1-9. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002873

36. **Bowman LR, Runge-Ranzinger S, McCall PJ.** Assessing the relationship between vector indices and dengue transmission: A systematic review of the evidence. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:1-11. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002848

Biomédica 2018;38:117-26
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.4055

ARTÍCULO ORIGINAL

Diversidad genética y estructura poblacional de *Anopheles triannulatus* s.l. en Córdoba, Colombia, determinadas mediante el método de región de código de barras de ADN

María Atencia-Pineda, Angie Toro-Cantillo, Richard Onalbi Hoyos-López

Grupo de Investigaciones en Enfermedades Tropicales y Resistencia Bacteriana, Universidad del Sinú, Montería, Colombia

Introducción. A pesar de los recientes reportes de infección con *Plasmodium* spp. en poblaciones relacionadas con los linajes noroeste y sureste, *Anopheles triannulatus* no está incriminado como vector de la transmisión de malaria en Colombia. La diversidad genética puede delimitar la información sobre el flujo génico y la diferenciación poblacional entre localidades con malaria.
Objetivo. Estimar la diversidad genética de *An. triannulatus* en cinco municipios con alta y baja incidencia de malaria en el departamento de Córdoba.
Materiales y métodos. La recolección entomológica se hizo entre agosto y noviembre de 2016 en los municipios de Tierralta, Puerto Libertador, Montelíbano, Sahagún y Planeta Rica. Como marcador genético, se utilizó la región de código de barras de ADN del gen mitocondrial *COI*. El análisis genético incluyó la estimación de los parámetros de diversidad haplotípica, estructura genética y flujo génico, la prueba D de neutralidad de Tajima, la red de haplotipos y las relaciones filogenéticas.
Resultados. Se obtuvieron 148 secuencias parciales de 655 nucleótidos del gen *COI*, de los cuales se derivaron 44 haplotipos. Los haplotipos H2 y H21 fueron los más frecuentes en las poblaciones. Los valores de la prueba D de Tajima fueron negativos y no significativos (p>0,10). Los estimadores de estructura genética (F_{ST}=0,01427) y de flujo génico (Nm=17,27) evidenciaron que no hubo diferenciación genética en las poblaciones muestreadas debido al importante intercambio de migrantes. Mediante las inferencias filogenéticas y la red de haplotipos, se identificó una sola especie sin diferenciación geográfica o de linajes en el rango geográfico estudiado.
Conclusión. La diversidad genética calculada para *An. triannulatus* en este contexto, indicó que las poblaciones están en un intercambio constante.

Palabras clave: *Anopheles*/genética; variación genética; haplotipos; flujo génico; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.4055

Genetic diversity and population structure of *Anopheles triannulatus* s. l. in the department of Córdoba, Colombia, using DNA barcoding

Introduction: *Anopheles triannulatus* is not incriminated as a vector of malaria transmission in Colombia despite recent reports of infection with *Plasmodium* spp. in populations related to the northwestern and southeastern lineages. Genetic diversity can delimit information about gene flow and population differentiation in localities with malaria.
Objective: To estimate the genetic diversity of *An. triannulatus* in five municipalities with high and low incidence of malaria in the department of Córdoba.
Materials and methods: The entomological collections were done between August and November, 2016, in Tierralta, Puerto Libertador, Montelíbano, Sahagún, and Planeta Rica. We used the *COI* barcoding fragment as molecular marker. The genetic analysis included the estimation of genetic parameters such as the diversity haplotype, the genetic structure, the gene flow, the Tajima's D test, the haplotype network, and the phylogenetic relationship.
Results: We obtained 148 sequences with a length of 655 nucleotides of the *COI* gene, from which we derived 44 haplotypes. The H2 and H21 haplotypes were the most frequent in the populations. The values of the Tajima's D test were negative and not significant (p>0.10). The genetic structure index (F_{ST}=0.01427) and the gene flow (Nm=17.27) evidenced no differentiation between sampled

Contribución de los autores:
Maria Atencia-Pineda: experimentos y trabajo de campo, análisis de los datos y escritura del manuscrito
Angie Onalbi Toro-Cantillo: experimentos y trabajo de campo
Richard Onalbi Hoyos-López: diseño del estudio, análisis de los datos y escritura del manuscrito

populations due to the high exchange of migrants. Using phylogenetic inferences and the haplotype network, we identified one single species without geographic differentiation or lineages in the geographic range studied.

Conclusions: The genetic diversity calculated for *An. triannulatus* in this context indicated stable populations in constant exchange.

Key words: *Anopheles*/genetics, genetic variation; haplotypes; gene flow; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.4055

Anopheles triannulatus (Neiva y Pinto, 1922) pertenece al grupo Oswaldoi del subgénero *Nysorhynchus*, y se encuentra distribuido en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guayana Francesa, Guatemala, Guyana, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Puerto Rico, Surinam, Trinidad y Tobago, y Venezuela (1-3).

En Colombia, esta especie se distribuye en 29 de los 32 departamentos (4). Su importancia como vector en la transmisión de la malaria o paludismo es relativa, pues se basa en evidencia circunstancial o en la identificación de la proteína del circumsporozoíto (*Circumsporozoite Protein*, CSP) de *Plasmodium vivax* (genotipos VK210 y VK247), *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium malariae* en hembras (5,6). Se ha considerado como un vector secundario local de la malaria en varias zonas de Brasil (7,8) y como vector dominante en el este de Loreto, Perú (9). Recientemente, se detectó *An. triannulatus* infectado con el genotipo VK247 de *P. vivax* en El Bagre, Antioquia, y con *P. falciparum* en Puerto Libertador, Córdoba, con una abundancia significativa de la especie en este último sitio (28 % del total de *Anopheles* spp.) (10,11). Sin embargo, a pesar de los reportes de infección natural con especies de *Plasmodium*, en Colombia no se ha incriminado como vector.

Anopheles triannulatus se considera un complejo de tres especies (*Anopheles triannulatus* s.s., *Anopheles halophylus* y *Anopheles triannulatus* C) por la amplia diversidad morfológica en los genitales masculinos, los huevos y las larvas. Además, se han reportado algunas diferencias en los patrones de distribución, en su ecología y su comportamiento (12-14). Asimismo, se conocen algunos resultados y datos moleculares sobre aloenzimas que permitieron diferenciar entre *An. halophylus* y *An. triannulatus* (15) con base en el gen intemporal y el gen *CPR*; con el primero, no se pudieron diferenciar las tres especies que conforman el complejo *An. triannulatus*, en tanto que con el segundo se diferenciaron claramente (16). Esta amplia diversidad implicaría diferencias en la transmisión de *Plasmodium* spp. y en el comportamiento de picadura (antropofílico y zoófilo) según la distribución geográfica, como se ha propuesto para otras especies (17-20). En Colombia, solo se ha reportado la presencia de *An. triannulatus* s.l., pero las otras dos especies que conforman el complejo no se han encontrado en el país (10,21).

En Colombia, hay pocos estudios de genética de poblaciones y estructura genética de *An. triannulatus* s.l. encaminados a resolver el estatus taxonómico de la especie, lo cual permite estudiar los linajes y especies del complejo. En este sentido, el estudio de Rosero, *et al*. (21), es el más relevante, ya que los autores diferenciaron dos linajes (sureste y noroccidente) con flujo génico limitado y una estructura genética divergente con base en las secuencias del *COI* y del ITS2 (*Internal Transcribed Spacer 2*).

En esta investigación, los especímenes de *An. triannulatus* recolectados en Puerto Libertador, se agruparon en el clado noroccidente y se relacionaron filogenéticamente con individuos del Bajo Cauca (El Bagre) y el Urabá antioqueño (San Pedro de Urabá), y en el linaje sureste se agruparon los individuos recolectados en los departamentos del Meta y Amazonas (Leticia, Puerto Nariño y Tarapacá) (11), linajes que concuerdan con su ubicación geográfica.

A pesar de este hallazgo, persisten algunos vacíos, pues el estudio se restringió a cuatro departamentos y, en el caso del departamento de Córdoba (con muchas áreas de alta y baja endemia para malaria), solo se estudió la población de Puerto Libertador. Por ello, sería de gran importancia ampliar la recolección a todos los departamentos y municipios donde se encuentra distribuida la especie, para recabar información sobre el estatus real de *An. triannulatus* en Colombia. Además, se

Correspondencia:
Richard Onalbi Hoyos, Laboratorio de Investigaciones en Ciencias Biomédicas y Biología Molecular, Universidad del Sinú, carrera 1w N° 38-153, Montería, Colombia
Telefax: (574) 784 1961
rhoyoslopez@gmail.com

Recibido: 01/09/17; aceptado: 12/06/18

requieren otras herramientas moleculares para complementar el estudio de la morfología de los estadios inmaduros, los genitales de los machos y la morfometría geométrica, con el fin de acopiar información confirmada sobre este complejo en el país.

En objetivo del presente estudio fue establecer cómo se relacionaban las poblaciones de *An. triannulatus* de tres municipios endémicos para malaria y otros dos no endémicos en el departamento de Córdoba, estimando la distribución y la diversidad de haplotipos, calculando el flujo génico y haciendo la diferenciación genética de las poblaciones muestreadas, así como la relación filogenética de los individuos recolectados en el departamento de Córdoba con los de otras áreas de Colombia mediante el método de código de barras (*barcoding*) de ADN del gen de la citocromo oxidasa I (*COI*).

Materiales y métodos

Recolección y procesamiento de los mosquitos

Las recolecciones se hicieron entre agosto y noviembre del 2016 en cinco municipios del departamento de Córdoba utilizando trampas Shannon y CDC durante tres días, entre las 18:00 y las 00:00 horas (figura 1) (cuadro1). La identificación taxonómica de las hembras de *An. triannulatus* s.l. se basó en la clave dicotómica para la identificación de anofelinos en Colombia (4). El ADN se extrajo del abdomen del insecto utilizando el método de altas concentraciones de sales descrito por Collins, *et al.* (22), modificado por Atencia, *et al.* (23).

Amplificación de la región de código de barras del gen COI

En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron los cebadores universales LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' y HCO 2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3', en un volumen final de 30 µl y usando 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,3 µM de cada cebador, 1X de solución tampón (con 1,5 mM de $MgCl_2$), 2 unidades de Taq polimerasa (TopTaq™, Qiagen) y 2 µl de ADN, todo ajustado con agua ultrapura estéril (24).

El perfil térmico consistió en un primer ciclo de desnaturalización a 95 °C durante cinco minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 94 °C, un alineamiento a 46 °C durante un minuto, una extensión a 72 °C durante un minuto y un paso final de extensión a 72 °C durante 10 minutos. Los productos amplificados, teñidos con bromuro de etidio, se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. La secuenciación de los productos de la PCR se hizó con el sistema de Macrogen, Inc., en un secuenciador ABI PRISM™ (Applied Biosystems).

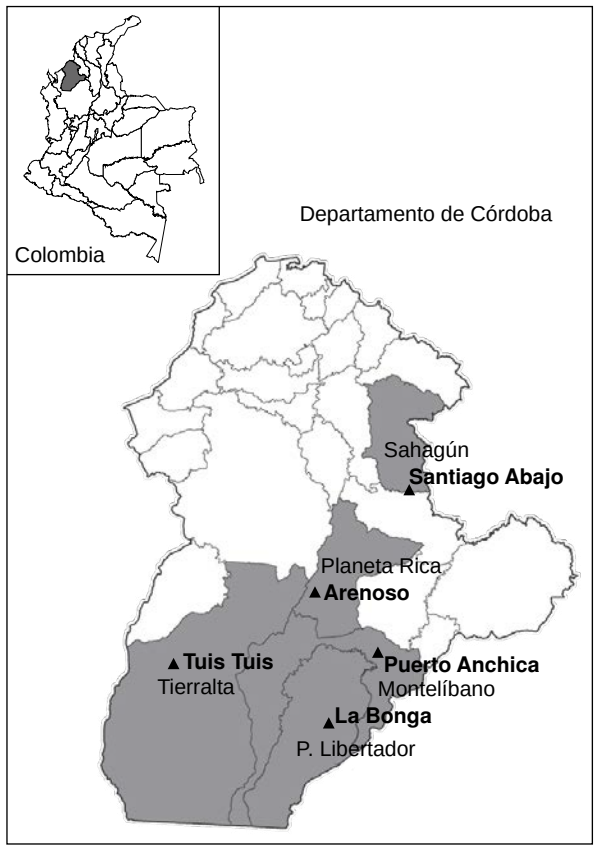

Figura 1. Distribución de las localidades de recolección de *Anopheles triannulatus* s.l. en el departamento de Córdoba, Colombia

Cuadro 1. Sitios de recolección y número de individuos recolectados (n) de *Anopheles triannulatus* s. l. en el departamento de Córdoba, Colombia

Municipio, localidad	n	Coordenadas (latitud, longitud)
Tierralta, Tuis Tuis	76	7,95112-76,25753
Puerto Libertador, La Bonga	25	7,73731-75,68668
Montelíbano, Puerto Anchica	25	7,99530-75,50817
Sahagún, Santiago Abajo	11	8,58783-75,39235
Planeta Rica, Arenoso	11	8,21764-75,73914

Análisis de los datos

Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon con el programa MEGA, versión 7.0 (25) y, el alineamiento múltiple, con el programa CLUSTAL

W (26). A cada secuencia de consenso se le hizo el alineamiento con el programa BLASTn (27), con el fin de comparar las secuencias de *An. Triannulatus* s.l. almacenadas en el GenBank y en *Barcode of Life Data System* (Bold Systems) (28).

El número de haplotipos y su frecuencia, el número de sitios polimórficos (S), el número promedio de diferencias de nucleótidos (k), la diversidad de haplotipos (DH) y la diversidad de nucleótidos (π), la prueba D de neutralidad de Tajima y la distribución de diferencias (*mismatch*), se calcularon con el programa DnaSP, versión 5 (29). Los estimadores de estructura genética (F_{ST}) y de flujo génico (Nm) se estimaron en el programa Arlequin, versión 3.5 (30).

Red de haplotipos y análisis filogenético

La red estimada entre los haplotipos caracterizados se graficó con el programa Network, versión 5.0 (31) y el algoritmo *median-joining* (32). El modelo evolutivo se infirió con base en los criterios de información Akaike (AIC) incluidos en el programa jModelTest, versión 2 (33). Esta información se utilizó para la inferencia filogenética bayesiana con el programa MrBayes, versión 3.2 (34).

Con la cadena de Markov-Monte-Carlo se obtuvieron 10 millones de generaciones. Para la construcción del árbol se utilizaron secuencias de *An. triannulatus* s.l. de Colombia reportadas en el GenBank: JX205111.1 – JX205113.1, HM022387.1-HM022389.1 y KY921784.1.

Resultados

Análisis de la región de código de barras del COI

Se recolectaron 148 hembras de *An. triannulatus* s.l. en las cinco localidades muestreadas (cuadro 1). La longitud de las secuencias del gen *COI* obtenidas de cada individuo fue de 655 nucleótidos, con un contenido promedio de A+T de 69 %. Se encontraron 44 haplotipos mitocondriales del gen *COI* (GenBank NA MF043261 a MF043304) (cuadro 2). Las secuencias presentaron 620 sitios conservados y 35 posiciones variables (21 sitios fueron parsimoniosamente informativos y 14 sitios de mutaciones únicas); se distinguieron 158 transiciones y 9 transversiones (cuadro 3). Las distancias genéticas intraespecíficas alcanzaron un valor máximo de 0,016, observado entre los pares de los haplotipos H32-H40 y H37-H40.

Diversidad genética, prueba de neutralidad y estructura genética

Los valores de los índices de diversidad genética y la prueba de neutralidad para las cinco poblaciones de *An. triannulatus* s.l. se muestran en el cuadro 4. Los promedios más altos en K, DH y π fueron los correspondientes a La Bonga (Puerto Libertador) y Santiago Abajo (Sahagún). La prueba de neutralidad arrojó valores negativos, con excepción de los especímenes de Arenoso (Planeta Rica), en los que fue positiva, pero no significativa (p>0,10). La distribución de diferencias fue unimodal, es decir, que había expansión poblacional (figura 2). Las distancias genéticas entre las poblaciones fueron bajas, en un rango de 0,00387 a 0,00516.

En general, los valores pareados de la estructura genética fueron de F_{ST}=0,01427 y los del flujo génico de Nm=17,27 para todas las poblaciones muestreadas, lo cual implica una diferenciación genética nula entre las poblaciones y un elevado intercambio de migrantes (cuadro 5).

Cuadro 2. Número y frecuencia de haplotipos de *Anopheles triannulatus* s.l. en cinco poblaciones del departamento de Córdoba, Colombia

Municipio y localidad	Haplotipos (frecuencia)	Total de haplotipos
Tierralta, Tuis Tuis	H1(2), H2(21), H3(5), H4(5), H5(1), H6(1), H7(1), H8(3), H9(1), H10(2), H11(1), H12(3), H13(3), H14(1), H15(1), H16(4), H17(2), H18(1), H19(4), H20(1), H21(4), H22(1), H23(2), H24(1), H25(1), H26(1), H27(1), H28(1), H29(1)	29
Puerto Libertador, La Bonga	H2(5), H3(3), H13(1), H16(3), H21(4), H23(1), H30(1), H31(1), H32(1), H33(1), H34(1), H35(1), H36(1), H37(1).	14
Montelíbano, Puerto Anchica	H2(5), H3(3), H4(2), H13(1), H17(1), H21(8), H38(1), H39(1), H40(1), H41(1), H42(1).	11
Sahagún, Santiago Abajo	H1(1), H2(2), H3(3), H13(1), H17(1), H21(1), H23(1), H43(1).	8
Planeta Rica, Arenoso	H2(4), H3(2), H4(1), H21(3), H44(1).	5
Total	H1(3), H2(37), H3(16), H4(8), H5(1), H6(1), H7(1), H8(3), H9(1), H10(2), H11(1), H12(3), H13(6), H14(1), H15(1), H16(7), H17(4), H18(1), H19(4), H20(1), H21(20), H22(1), H23(4), H24(1), H25(1), H26(1), H27(1), H28(1), H29(3), H30(1), H31(1), H32(1), H33(1), H34(1), H35(1), H36(1), H37(1), H38(1), H39(1), H40(1), H41(1), H42(1), H43(1), H44(1).	44

Cuadro 3. Sitios variables en la secuencia del gen *COI* de 44 haplotipos de *Anopheles triannulatus* s.l. Los puntos (**.**) denotan homología de nucleótidos.

	Posiciones																																		
						1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	2	3	8	9	9	0	8	8	0	2	3	4	7	1	2	2	3	5	5	7	8	8	9	5	5	6	0	0	1	2	2	2	3	3	4
	7	3	1	0	6	5	3	6	1	2	7	9	3	8	4	3	8	3	9	4	0	4	2	2	9	4	3	9	8	2	4	7	3	6	8
H1	T	T	T	A	T	T	A	A	G	T	T	T	A	G	G	T	T	T	A	T	A	A	T	A	T	A	T	C	C	G	T	A	A	C	C
H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H3	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H4	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H5	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H6	.	.	.	G	.	.	.	.	A	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	G	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H8	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
H9	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H10	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H11	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H13	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H14	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	.	.	T
H16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H17	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	T
H19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H20	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	A	A	.	.	.	G	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H21	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H22	.	.	C	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H23	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H24	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T
H25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	T
H26	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H27	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T
H28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
H29	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H30	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T
H31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T
H32	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H33	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H34	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H35	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T
H36	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H37	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T
H38	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H39	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H40	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	A	A	.	.	.	G	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H41	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H42	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H43	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T
H44	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T

Red de haplotipos y análisis filogenético

En la figura 3 se muestra la red inferida para las poblaciones de *An. triannulatus* s.l. El torso de la red está estructurado por los haplotipos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 16, 18, 19, 21, 23, 25, 29, 31 y 35; los haplotipos más frecuentes fueron H2 (25 %) y H21 (13,5 %). Estos dos haplotipos se establecieron en todas las poblaciones. El árbol filogenético obtenido con inferencia bayesiana evidenció un único clado monofilético para todos los haplotipos caracterizados de *An. triannulatus* s.l. en Córdoba; la segregación geográfica no se evidenció o no se definieron linajes dentro del clado estimado (figura 4).

Discusión

Según la inferencia filogenética bayesiana efectuada en el presente estudio, los ejemplares de *An. triannulatus* s.l. en Córdoba correspondían

Cuadro 4. Parámetros de diversidad genética y prueba de neutralidad en cinco poblaciones de *Anopheles triannulatus* s.l. del departamento de Córdoba, Colombia. NH: número de haplotipos en cada población; S: sitios polimórficos; K: número promedio de divergencias nucleotídicas; DH: diversidad de haplotipos; π: diversidad nucleotídica. En la prueba de neutralidad no se encontraron diferencias estadísticas (p>0,10).

Municipio	Localidad	NH	S	K	DH	π	Tajima's D
Tierralta	Tuis Tuis	29	28	3,11404	0,90842	0,00475	-1.42043
Puerto Libertador	La Bonga	14	14	3,38667	0,92667	0,00517	-0.30050
Montelíbano	Puerto Anchica	11	14	2,93000	0,86000	0,00447	-0.91886
Sahagún	Santiago Abajo	8	11	3,45455	0,92727	0,00517	-0.34492
Planeta Rica	Arenoso	5	5	2,25455	0,81818	0,00344	1.22875
Total		44	35	3.18174	0,90182	0,00486	-1,50819

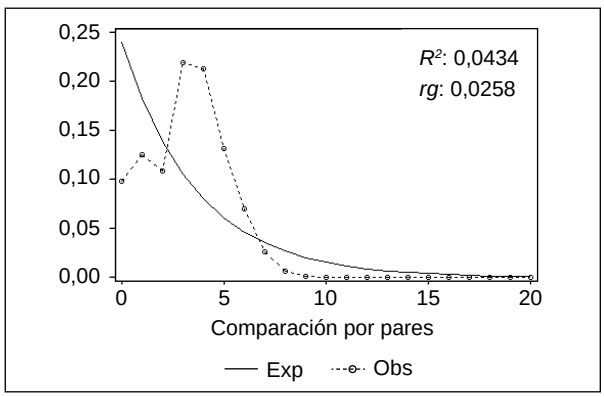

Figura 2. Gráfica de distribución de diferencias (*mismatch*) entre haplotipos de *Anopheles triannulatus* s.l. de cinco poblaciones del departamento de Córdoba, Colombia

Cuadro 5. Distancia genética y flujo génico basados en los valores F_{ST} (arriba de la diagonal), el índice de fijación y el Nm (abajo de la diagonal) del número de migrantes efectivos en cinco poblaciones de *Anopheles triannulatus* s. l.

Localidad	Tuis Tuis	La Bonga	Puerto Anchica	Santiago Abajo	Arenoso
Tuis Tuis	-	0,031	0,093	0,011	0,035
La Bonga	15,386	-	0,066	-0,031	0,015
Puerto Anchica	4,856	7,048	-	-0,032	-0,037
Santiago Abajo	46,211	inf	inf	-	-0,056
Arenoso	13,889	31,869	inf	inf	-

exclusivamente a un linaje monofilético agrupado en un clado. Los datos del código de barras evidenciaron una diferenciación genética nula entre las poblaciones sometidas a prueba, pertenecientes a áreas con una mayor transmisión de malaria en el contexto microgeográfico para el departamento de Córdoba.

En esta área se han establecido patrones similares para otras especies como *An*. *darlingi* (35), *An*. *albimanus* (19) y *An*. *nuneztovari* s.l. (36). Todas estas especies mostraron una gran diversidad genética homogénea en este nivel geográfico, donde no hay aislamiento por distancia o segregación genética (figura 4). Curiosamente, a pesar de las barreras importantes que son los ríos Sinú y San Jorge, y de las diferencias ecológicas y climáticas entre las zonas muestreadas (bosque húmedo tropical en Tierralta y Puerto Libertador, y bosque seco tropical en Montelíbano, Planeta Rica y Sahagún), Tierralta, Puerto Libertador y Montelíbano son localidades con gran endemia de malaria, y hubo pocos o ningún caso en Sahagún y Planeta Rica.

La diversidad de haplotipos fue significativa y la red permitió observar muchos compartidos por todas las localidades, lo que sugiere una historia evolutiva similar para esta especie en el departamento de Córdoba (figura 3). Otra evidencia de esta hipótesis es la agrupación de especímenes recolectados en Puerto Libertador con poblaciones de Antioquia (El Bagre, Zaragoza y San Pedro de Urabá), lo cual estructuraría el linaje noroccidente para *An. triannulatus* s.l. con base en marcadores moleculares como el *COI* y el ITS2 (21).

Los valores estimados para F_{ST} y Nm sugieren un gran flujo génico entre las poblaciones muestreadas y una estructura genética nula; en este sentido, la diversidad genética de haplotipos y los valores de la prueba D de Tajima corresponden a una expansión de la población y no a la presión selectiva, lo cual implica que *An. triannulatus* s.l. comprende una sola población; estos resultados son similares a los de poblaciones de *An. triannulatus* s.l. estudiadas con base en secuencias del *COI* (no código de barras) en el río Amazonas, y el centro y el sur de Brasil (37). En Colombia, la distribución desigual de los linajes noroccidente y sureste evidenció una distribución bimodal, lo cual sugiere un cuello de botella o eventos de colonización entre las localidades muestreadas (21).

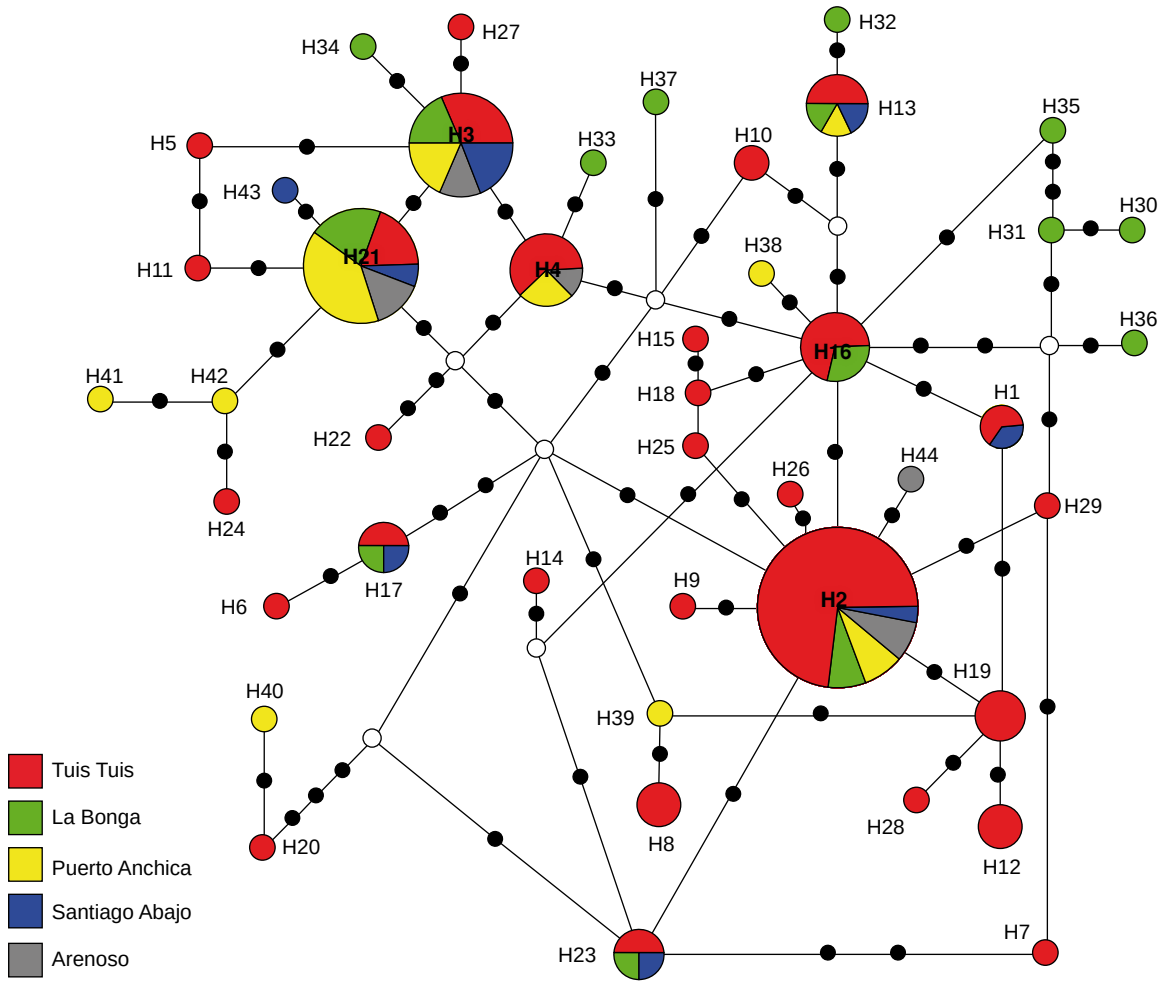

Figura 3. Red de haplotipos inferida con las secuencias del gen *COI* de 148 individuos de *Anopheles triannulatus* s.l. El área de cada círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipos. Los círculos negros representan los pasos de mutación y, los círculos blancos, los haplotipos desaparecidos o no muestreados. La fracción de cada círculo indica la frecuencia de los haplotipos presentes en las poblaciones estudiadas.

La expansión poblacional evidenciada por la prueba D de Tajima y la distribución de diferencias podría deberse a la presencia de haplotipos únicos en cada una de las poblaciones muestreadas, lo cual coincide con una gran diversidad genética (DH=0,90182). Valores similares se han registrado en especies como *Anopheles punctimacula* s.l. (DH: 0,6444 y 0,7222) (38), *Anopheles sinensis* (DH, 0,99) (39), *Anopheles nuneztovari* (40) y *Anopheles marajoara* de linaje 1 (DH: 0,828) y de linaje 2 (DH: 0,780) (41).

Algunos de los haplotipos encontrados en este estudio ya fueron reportados en un trabajo realizado en Córdoba por Ahumada, *et al.,* en el cual los haplotipos H2, H19, H21, H25 y H43 se nombraron como haplotipo 2; los H8 y H39, como haplotipo 8; el H10, como haplotipo 15; el H17, como haplotipo 6, y los H23 y H28, como haplotipo 3 (42). Sin embargo, es importante destacar que las secuencias reportadas por estos autores registraron una longitud de 607 nucleótidos, cuyo primer nucleótido tiene correspondencia con el nucleótido 6 y, el último, con el de la posición 612 de las secuencias obtenidas en este estudio, razón por la cual un haplotipo de los reportados por ellos es similar a varios de los de este estudio (42).

El árbol filogenético evidenció dos clados: uno conformado por secuencias de individuos pertenecientes al municipio del Meta y el otro formado por dos subclados correspondientes a las secuencias de Córdoba y de Turbo, Antioquia, y el otro, por secuencias de Putumayo, aunque con un soporte de rama bajo; estos resultados también coinciden con los obtenidos por Rosero, *et al.* (21).

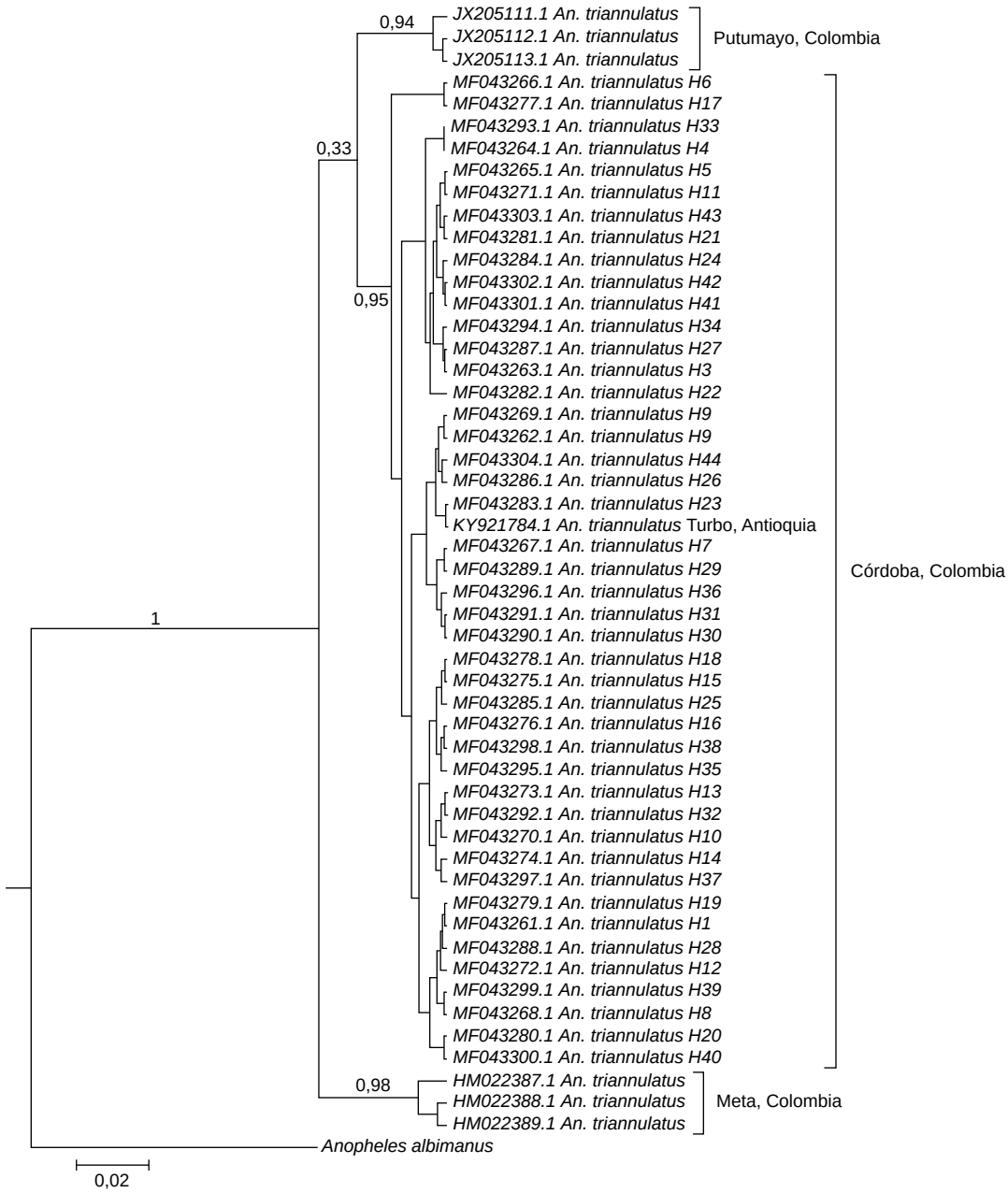

Figura 4. Árbol de inferencia filogenética bayesiana según el modelo de evolución molecular HKY + G + I con secuencias del gen *COI* caracterizado en cinco poblaciones de *An. Triannulatus* s. l. del departamento Córdoba, Colombia. El número sobre las ramas representa las probabilidades posteriores del clado.

Puede observarse que las secuencias de Córdoba y de Turbo, Antioquia, pertenecerían al linaje noroccidente y, las secuencias de Meta, al linaje sureste. Sin embargo, como ya se mencionó, el subclado correspondiente a las secuencias de Putumayo, que por ubicación geográfica debería haberse agrupado con los individuos del Meta para formar el clado sureste, se agrupó en un clado independiente con las secuencias de Córdoba. Ello indicaría que hay más de dos linajes de *An. triannulatus* s.l. en Colombia, hipótesis que deberá corroborarse ampliando las recolecciones a otros departamentos donde se distribuye la especie y, también, aumentando el número de ejemplares.

En conclusión, según nuestros resultados, las poblaciones de *An. triannulatus* s.l. de Córdoba se comportan como una gran población, con un gran flujo de migrantes entre las localidades en estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Financiación

Este estudio fue financiado por el Programa de Investigación en Salud y Enfermedades Tropicales, Convenio 754-2013, entre el departamento de Córdoba y la Universidad del Sinú-Elías Bechara Zainum.

Referencias

1. **Walter Reed Biosystematics Unit.** Systematic catalog of Culicidae, 2017. Fecha de consulta: 16 de marzo de 2018. Disponible en: http://www.mosquitocatalog.org.
2. **Faran M, Linthicum K.** A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1981;13:1-81.
3. **Chadde DD, Wilkerson R.** *Anopheles triannulatus* (Neiva and Pinto): A new *Anopheles* record from Trinidad, West Indies. J Am Mosq Control Assoc. 2005;21:316-7. https://doi.org/10.2987/8756-971X(2005)21[316:ATNAPA]2.0.CO;2
4. **González R, Carrejo N.** Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia: claves y notas de distribución. Segunda edicion. Cali: Universidad del Valle; 2009. p. 260.
5. **Sinka M, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil A, Temperley W, Gething P, *et al.*** The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: Occurrence data, distribution maps and bionomic précis. Parasit Vectors. 2010;3:72. https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-72
6. **Galardo AK, Arruda M, Couto AR, Wirtz R, Lounibos LP, Zimmerman RH.** Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2007;76:461-9. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.461
7. **Tadei WP, Thatcher BD.** Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2000;42:87-94. https://doi.org/10.1590/S0036-46652000000200005
8. **de Oliveira-Ferreira J, Lourenco-de-Oliveira R, Teva A, Deane LM, Daniel-Ribeiro CT.** Natural malaria infections in Anophelines in Rondania State, Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 1990;43:6-10.
9. **Aramburú J, Ramal C, Witzig R.** Malaria reemergence in the Peruvian Amazon Region. Emerg Infect Dis. 1999;5:209-15. https://doi.org/10.3201/eid0502.990204
10. **Naranjo-Díaz N, Rosero DA, Rúa-Uribe G, Luckhart S, Correa MM.** Abundance, behavior and entomological inoculation rates of anthropophilic anophelines from a primary Colombian malaria endemic area. Parasit Vectors. 2013;6:1-11. https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-61
11. **Rosero DN, Naranjo-Díaz N,** Álvarez **A, Cienfuegos C, Torres S, Luckhart S, *et al*.** Colombian *Anopheles triannulatus* (Diptera: Culicidae) naturally infected *with Plasmodium* spp. *ISRN Parasitol.* 2013:2013:927453. https://doi.org/10.5402/2013/927453
12. **Rosa-Freitas MG, Lourenço-de-Oliveira R, de Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C, Fernandes T, Do-Nascimiento S.** Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93:651-5. https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000500016
13. **Silva-do-Nacimiento T, Lourenço-de-Oliveira R.** *Anopheles halophylus*, a new species of the Subgenus *Nyssorhynchus* (Diptera: Culicidae) from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:801-11. https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000600010
14. **Rosa-Freitas MG, Tsouris P, Peterson AT, Honório NA, Barros FS, Aguiar DB, *et al.*** An ecoregional classification for the state of Roraima, Brazil. The importance of landscape in malaria biology. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:349-57. https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000052
15. **Silva-do-Nascimento TF, Wilkerson RC, Monteiro FA.** Molecular confirmation of the specific status of *Anopheles halophylus* (Diptera: Culicidae) and evidence of a new cryptic species within *An. triannulatus* in Central Brazil. J Med Entomol. 2006;43:455-9.
16. **Silva-do-Nascimento TF, Damazio L, Pitaluga R, Peixoto AA, Lourenço-de-Oliveira R.** Molecular divergence in the timeless and *cpr* genes among three sympatric cryptic species of the *Anopheles triannulatus* complex. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106:218-22. https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000900027
17. **Brochero H, Pareja PX, Ortiz G, Olano VA.** Sitios de cría y actividad de picadura de especies de *Anopheles* en el municipio de Cimitarra, Santander, Colombia. Biomédica. 2006;26:269-77. https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i2.1416
18. **Gutiérrez LA, González JJ, Gómez GF, Castro MI, Rosero DA, Luckhart S, *et al.*** Species composition and natural infectivity of anthropophilic *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Córdoba and Antioquia states in northwestern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:1117-24. https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000800008
19. **Gutiérrez LA, Naranjo NJ, Cienfuegos AV, Muskus CE, Luckhart S, Conn JE, *et al.*** Population structure analyses and demographic history of the malaria vector *Anopheles albimanus* from the Caribbean and the Pacific regions of Colombia. Malar J. 2009;8:259. https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-259
20. **Rodríguez M, Pérez L, Caicedo JC, Prieto G, Arroyo JA, Kaur H, *et al.*** Composition and biting activity of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in the Amazon Region of Colombia. J Med Entomol. 2009;46:307-15.
21. **Rosero DA, Jaramillo LM, Gutiérrez LA, Conn JE, Correa MM.** Genetic diversity of *Anopheles triannulatus* s.l. (Diptera: Culicidae) from Northwestern and Southeastern Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2012;87:910-20. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0285
22. **Collins FH, Méndez A, Rasmussen MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V.** Ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. Am J Trop Med Hyg. 1987;37:37-41. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.37.37
23. **Atencia M, Pérez M, Jaramillo M, Caldera S, Bejarano E.** Primer reporte de la mutación F1534C asociada con resistencia cruzada a DDT y piretroides en *Aedes aegypti* en Colombia. Biomédica. 2016;36:432-7. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2834

24. **Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R.** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol. 1994;3:294-9.

25. **Kumar S, Stecher G, Tamura K.** MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol. 2016;33:1870-4. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

26. **Thompson J, Higgins D, Gibson T.** CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994;22:4673-80.

27. **Altschup S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D.** Basic local alignment search tool department of computer science. J Mol Biol. 1990;215:403-10. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2

28. **Ratnasingham S, Hebert PDN.** Bold: The Barcode of Life Data System (http://www.barcodinglife.org). Molecular Ecology Notes. 2007;7:355-64. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x

29. **Librado P, Rozas J.** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 2009;25:1451-2. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187

30. **Excoffier L, Lischer HE.** Arlequin Suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol Ecol Resour. 2010;10:564-7. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x

31. **Fluxus Technology.** Network 5.0. Clare: Fluxus Technology Ltd.; 2017.

32. **Badelt H, Forster P, Rohl A.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol Biol Evol. 1999;16:37-48. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036

33. **Posada D.** jModelTest: Phylogenetic model averaging. Mol Biol Evol. 2008;25:1253-6. https://doi.org/10.1093/molbev/msn083

34. **Ronquist F, Huelsenbeck J.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. 2003;19:1572-4. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180

35. **Gutiérrez LA, Gómez GF, González JJ, Castro MI, Luckhart S, Conn JE, *et al.*** Microgeographic genetic variation of the malaria vector *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Córdoba and Antioquia, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2010;83:38-47. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0381

36. **Jaramillo LM, Gutiérrez LA, Luckhart S, Conn JE, Correa MM.** Molecular evidence for a single taxon, *Anopheles nuneztovari* s.l., from two endemic malaria regions in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106:1017-23. https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000800020

37. **Pedro PM, Uezu A, Sallum MA.** Concordant phylogeographies of 2 malaria vectors attest to common spatial and demographic histories. J Hered. 2010;101:618-27. https://doi.org/10.1093/jhered/esq054

38. **Urrea PA, Correa M, Naranjo-Díaz N.** Variabilidad genética de *Anopheles punctimacula* s.l. en dos localidades de la zona endémica para la malaria: el Bajo Cauca y Alto Sinú. Hechos Microbiológicos. 2014;5:51-62.

39. **Dai Y, Huang X, Cheng P, Liu L, Wang H, Wang H, *et al.*** Development of insecticide resistance in malaria vector *Anopheles sinensis* populations from Shandong province in China. Malar J. 2015;14:62. https://doi.org/10.1186/s12936-015-0592-8

40. **Scarpassa VM, Cunha-Machado AS, Saraiva JF.** Evidence of new species for malaria vector *Anopheles nuneztovari* sensu lato in the Brazilian Amazon region. Malar J. 2016;15:205. https://doi.org/10.1186/s12936-016-1217-6

41. **McKeon SN, Lehr M, Wilkerson RC, Ruiz JF, Sallum M, Lima JB, *et al.*** Lineage divergence detected in the malaria vector *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) in Amazonian Brazil. Malar J. 2010;9:271. https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-271

42. **Ahumada ML, Orjuela LI, Pareja PX, Conde M, Cabarcas DM, Cubillos EFG, *et al.*** Spatial distributions of *Anopheles* species in relation to malaria incidence at 70 localities in the highly endemic Northwest and South Pacific coast regions of Colombia. Malar J. 2016;15:407. https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000800008

Biomédica 2018;38:127-34
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.4413

ORIGINAL ARTICLE

Microcephaly in Colombia before the Zika outbreak: A systematic literature review

Estephanía Candelo[1,2], Gabriela Caicedo[1], Max M. Feinstein[3], Harry Pachajoa[1,4]

[1] Centro de Investigaciones en Anomalías Congénitas y Enfermedades Raras, Universidad ICESI, Cali, Colombia
[2] Biomaterials and Tissues Engineering, University College London, London, United Kingdom
[3] School of Medicine, Case Western Reserve University, Cleveland, United States
[4] Departamento de Pediatría, Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia

Introduction: Microcephaly is characterized by a smaller than normal head circumference. Recently, Zika virus (ZV) has been associated with microcephaly.
Objective: To describe the prevalence of microcephaly in Colombia taking as the baseline the information from the period before the Zika virus infection epidemics.
Materials and methods: We reviewed Medline, Scopus, Scielo, Lilacs and annual reports of congenital malformation monitoring systems across Latin America, among others sources, for articles published before April, 2015, reporting the prevalence of microcephaly in Colombia between 1982 and 2013.
Results: We identified 32 non-duplicate articles; we selected 25 articles for revision of which 12 met the criteria for inclusion in the systematic review, including 2,808,308 births.
Conclusions: The prevalence of microcephaly in Colombia from 1982 to 2013, before the introduction of ZV, ranged from 0.3 to 3.1 per 10,000 births, with an average of 1.8 (*95% CI* 1.7-1.8) per 10,000 births. These findings are important to determine if the prevalence after the introduction of the Zika virus infection registered significant changes.

Key words: Microcephaly; Zika virus infection; congenital abnormalities; prevalence; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.4413

Microcefalia en Colombia antes de la epidemia del Zika: revisión sistemática de la literatura

Introducción. La microcefalia consiste en una circunferencia cefálica menor de la esperada. Recientemente, el virus del Zika se ha asociado con esta condición.
Objetivo. Describir la prevalencia de la microcefalia en Colombia, estableciendo como línea de base el periodo anterior a la epidemia del virus del Zika.
Materiales y métodos. Se revisaron las bases de datos Medline, Scopus, Scielo, Lilacs y el reporte anual de malformaciones congénitas en Latinoamérica, así como otras fuentes publicadas antes de abril de 2015 con los datos de prevalencia de la microcefalia en Colombia entre 1982 y 2013.
Resultados. Se detectaron 32 artículos no duplicados, se revisaron 25 y se seleccionaron 12 que cumplían con los criterios de inclusión para la revisión sistemática, los cuales registraban 2'808.308 nacimientos.
Conclusiones. La prevalencia de la microcefalia en Colombia entre 1982 y 2013, antes de la epidemia del virus del Zika, oscilaba entre 0,3 y 3,1 por 10.000 nacimientos, con un promedio de 1,8 ($IC_{95\%}$ 1,7-1,8). Este dato es importante para determinar la diferencia en la prevalencia después de la introducción del virus del Zika en Colombia.

Palabras clave: microcefalia; infección por el virus del Zika; anomalías congénitas; prevalencia; Colombia.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.4413

Corresponding author:
Harry Pachajoa, MD, Centro de Investigaciones en Anomalías Congénitas y Enfermedades Raras, Universidad ICESI, Calle 18 N° 122-135, Cali, Colombia
Telephone: (572) 555 2334; fax: (216) 368 0564
hmpachajoa@icesi.edu.co

Received: 03/12/18; accepted: 06/15/18

The most common defects found in newborns in South America are cardiac alterations (28 per 10,000 live births), defects of the neural tube closure (24 per 10,000 live births), Down syndrome (16 per 10,000 live births), cleft lip and cleft palate (15 per 10,000 live births), and defects of the

Author's contributions:
Estephanía Candelo and Harry Pachajoa: conception and design of the study
All authors contributed to the data analysis and interpretation and to the writing of the manuscript.

abdominal wall (4 per 10,000 live births) (1). Some congenital defects, such as microcephaly, are reported less frequently due to their low prevalence. Given the introduction of Zika virus (ZV), however, microcephaly has gained clinical relevance.

Microcephaly is an important neurological manifestation that may result from insults to early brain development. It is part of the hundreds of genetic syndromes (2) and it has been variably defined in the literature. The World Health Organization (WHO) defines microcephaly as a head circumference less than two standards below the median for age and sex, and severe microcephaly as a head circumference less than three standard deviations below the median for age and sex (3). One study reported that approximately 61% of children with a head circumference less than two standard deviations have no abnormal findings on evaluation with imaging techniques (4). When imaging techniques reveal brain malformations, the following findings have been documented: Ventricular dilatation, mild atrophy (31%), moderate to severe atrophy with ventricular dilation (28%), and isolated parenchymal abnormalities (2%) (4). Other studies using magnetic resonance imaging (MRI) have reported the presence of brain abnormalities in 67-80% patients with microcephaly (5,6). MRI is the most sensitive diagnostic tool for the evaluation of microcephaly.

Microcephaly may be congenital or postnatal (7), which means a failure in brain growth after birth. It is also described as syndromic or primary (known as vera microcephaly). This classification depends on the presence or absence of extra-cranial malformations or facial dimorphism (2). Microcephaly is sometimes the first sign of a congenital condition, a genetic anomaly or an acquired problem (due to congenital infection) (8). Genetic causes have been reported in approximately 15.5% to 53.3% of cases. The prevalence of metabolic disorders is unknown, but it is estimated to be 1% to 5%. The conditions associated with microcephaly include epilepsy (40%), cerebral palsy (20%), intellectual disability (50%) and eye problems (20-50%) (2). A diagnosis of microcephaly has serious clinical implications, as there is a direct correlation between the degree of microcephaly and the degree of intellectual disability (9).

Since the end of 2015, microcephaly has received global attention due to the ZV epidemic in the Americas. Different criteria for causality have been established, including a spatial-temporal relationship and biological plausibility that entails identification of ZV in the brain tissue of affected fetuses (10). Animal models have been developed to try to provide a pathophysiological explanation for microcephaly via congenital infection with the virus (11). In February 2016, the first case of intrauterine transmission of ZV was reported, which featured neurological malformations in the fetus (12). In the months following the emergence of ZV in Brazil, an annual increase of up to 20 times the number of cases of birth defects has been reported, with a marked increase in microcephaly in particular (13). In 2015, 1,248 new suspected cases of microcephaly were reported in Brazil, with a prevalence of 99.7 per 100,000 live births. With these observations, the Brazilian Ministry of Health confirmed the relationship between ZV and microcephaly (14). Subsequently, WHO declared an epidemiological alert regarding ZV and its association with congenital malformations and neurological syndromes (15). Thus, ZV and its association with birth defects have recently become a public health problem of international importance (16).

So far, associative epidemiological links exist between ZV and microcephaly. This has resulted from the increase in the number of newborn infants with microcephaly (13,17) in countries where there is a high rate of suspected and confirmed cases of infection by ZV (18). Some hypotheses suggest that the teratogenic mechanisms of ZV are associated with the precipitation and deregulation of retinoic acid-dependent genes, extending the sequences in the genome that are closely involved with the development of the brain. This mechanism is known to be associated with other neurotropic viruses. For this reason, the spectrum of malformations generated by hypervitaminosis A presents with an embryopathy that appears similar to that of ZV (19,20). Other researchers suggest a direct immune effect of the virus on neuronal cells as demonstrated in animal models where the high replication rate of ZV in progenitors of neuronal cells, which have a high concentration of viral receptors, is suggested to be the gateway to the entrance of the virus to the brain. Immunoreactivity with markers associated with cell death, such as caspases, leads to apoptosis of these cells and pyramidal corticospinal neurons, which ultimately generate the appearance of microcephaly as an external feature (21).

In Colombia, there were 657,126 reported cases of infection by ZV from April to June, 2016. Four percent of these cases were confirmed by PCR.

The infection rate was two times higher in women than in men. Within this infected population, 11,944 pregnant women were reported, with 12% of these ZV cases confirmed by PCR; 90% of pregnant women who reported this infection gave birth to children with no apparent abnormalities. Fifty newborns were reported with possible microcephaly; 26 of these cases are still being investigated, while 20 have confirmed congenital defects that caused genetic and neural tube defects. Of these patients, four have evidence of congenital ZV infection that presents with microcephaly and without co-infections (22). It is important to understand the prevalence of microcephaly in Colombia in the years prior to the ZV epidemic in order to have a starting point to establish comparisons after its arrival to Colombia and assess its possible involvement in birth defects of the central nervous system, such as microcephaly.

In order to assess the prevalence of microcephaly in Colombia prior to the ZV epidemic, we conducted a systematic review of the literature. Articles included for consideration in the present study were those that addressed Colombian patients with microcephaly, as reported between 1982 and 2013. The primary outcome studied was the prevalence of microcephaly in Colombia during this period. The secondary outcome was the prevalence of birth defects of the central nervous system in Colombia during the period.

Materials and methods

The protocol for the systematic review was registered in the United Kingdom National Institute of Health and Research International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) as number 48859.

The objective of the systematic review was to determine the prevalence of birth defects in Colombia from 1982 to 2013. Articles published in Spanish, English, and Portuguese were included. The inclusion criterium was cross-observational studies that determined the prevalence of birth defects in Colombia, including microcephaly as defined by the Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations (ECLAMC). We excluded articles in which the diagnosis was done during the prenatal period, due to the absence of confirmation of microcephaly in these studies. The outcomes measured were the prevalence of microcephaly and the prevalence of central nervous system birth defects in Colombia between 1982 and 2013.

The search of the literature was performed in the different international, Latin American and national (Medline, Scopus, Science Direct, Lilacs, Dare, Bireme, and Cochrane) databases. The following Medical Subject Headings (MeSH) search terms were used: “birth defects,” “microcephaly,” “prevalence,” and “Colombia.” Additional Latin American and national data were obtained from the annual reports of the epidemiological surveillance of congenital malformations for articles published before April, 2015; the last search was performed in October, 2016. We searched for additional literature in the references reported in indexed articles. Moreover, some authors were contacted for additional sources of information. The eligible study designs included cross-sectional observational studies, cohort, case-control, ecological, and reports of the epidemiological surveillance of congenital malformations.

Articles and abstracts were examined independently by two reviewers in order to select those to be considered for complete text review based on the inclusion and exclusion criteria and, in case of disagreement, a third reviewer assessed the article and the decision was made by consensus. The data collected from each study were the number of cases of microcephaly, the period of time studied, the number of births and the number of defects of the central nervous system.

The limitations of the study include the fact that the definition of microcephaly varies in the literature. The definition used for data collection in this study, as well as in the majority of the reviewed articles, was head circumference less than three standard deviations of the mean for age and sex. To control this selection bias, we included studies performed in institutions using the ECLAMC criteria, since the institutions using this surveillance system feature a greater sensitivity, uniformity, and coverage of defects compared to those monitored by the surveillance system (*Sistema de Vigilancia en Salud Pública*, Sivigila) of the *Instituto Nacional de Salud* (23). In addition, another possible risk of bias was the failure to include a study in which microcephaly was evaluated. Therefore, we designed a system for searching those articles in which databases were searched and, subsequently, references in the articles found in order to minimize the loss of data.

Data analysis

We collected the data from eligible studies considering the study design, year of publication, authors, area, and period of the study. The following information was extracted from each article: The

total number of malformations, the number of cases of microcephaly reported, the number of nervous system malformations, and the number of births in the period studied. These data were then combined and used to calculate the rates per 10,000 live births. In order to avoid repeating data, if the participants were included in more than one study, only the study with the greater sample size was included.

Results

Using the MeSH terms defined in the methodology, 32 articles were identified in the different databases, references and monitoring systems of national birth defects. Initially, the repeated articles were excluded, and after filtering the articles and applying the inclusion and exclusion criteria, 28 articles were eligible, of which 12 were included in the review since they accomplished the primary and secondary objectives of the research (figure 1).

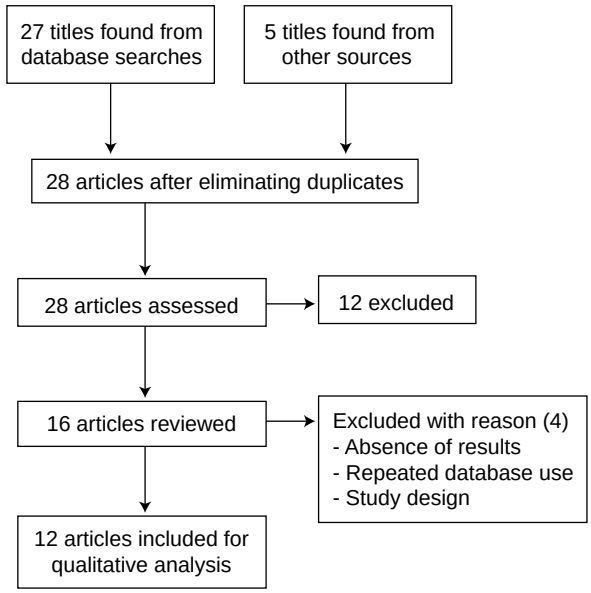

Figure 1. Flowchart of the study selection

The studies reviewed were published between 2003 and 2015 in Brazil and Colombia, all using data from Colombia. The period evaluated included 2,808,308 births, 21,363 malformations, 1,680 neurological malformations and 420 cases of microcephaly (table 1).

During the period evaluated, the surveillance system (Sivigila) of the *Instituto Nacional de Salud* was started started. In 2009, a pilot test was developed and an annual report for the 2010 period was published. During the period 2010-2013, there were 2,655,796 births, of which 0.35% had defects of some kind, including 1,248 reported malformations of the central and peripheral nervous system, which corresponded to an average of 15.8% of all congenital malformations reported, with a prevalence of 4.85 per 10,000. Of these, 3.38% corresponded to microcephaly, with an average prevalence of 1.17 cases per 10,000 births (table 2).

The prevalence of birth defects in the country varied between 8.7 and 68.9 per 10,000 live births from 2010 to 2013 according to Sivigila, an increase directly related with the coverage of this program nationwide. The highest reported rate of birth defects came from Bogotá, reaching 430.8 per 10,000 births. The lowest rate came from the department of Risaralda, reported as 89.8 per 10,000 births. The highest prevalence of microcephaly reported was from Bogotá, reaching

Table 1. Prevalence of microcephaly and central nervous system anomalies per 10,000 births in Colombia

Author, publication year, study period, study location	Microcephaly		Central nervous system anomalies	
	Number of cases	Number per 10,000 births	Number of cases	Number per 10,000 births
González Y, 2010, 2010, Colombia	21	00.3	128	2.0
González Y, 2011, 2011, Colombia	70	10.1	346	5.2
González Y, 2012, 2012, Colombia	74	10.1	237	3.5
Misnaza SP, 2013, 2013, Colombia	142	20.2	573	8.7
Pachajoa H, 2010,2004-2008, Cali, Colombia	5	10.5	114	34.6
Silva JR, 1998, 1987-1988, Barranquilla, Colombia	1	20.7	10	26.6
Ramírez J, 2015, 2011-2012, Cali, Colombia	2	00.5	28	49.4
López JS, 2015, 1982-2013, Colombia	77	30.1	ND	ND
García H, 2003, 1997-2000, Bogotá, Colombia	2	30.5	31	54.5
Porras GL, 2016, 2010-2013, Risaralda, Colombia	13	30.1	73	17.2
Zarante I, 2010, 2001-2008, Bogotá, Ubaté, Manizales, Colombia	13	20.5	103	19.5
Arteaga CE, 2003, 1991-1992, Bogotá, Colombia	0	0.0	37	40.1

Table 2. Description of articles consulted for the literature review

Author, publication year	Study objective	Study location	Study type	Study period	Study population	Sample size	Outcome variable definition	Biases
González Y, 2010	To report congenital anomalies in 2010	Colombia	Routine data from epidemiologic surveillance	2010	Births	654,627	Head circumference <3 standard deviations	Limited to coverage of the national surveillance network
González Y, 2011	To report congenital anomalies in 2011	Colombia	Routine data from epidemiologic surveillance	2011	Births	665,499	Head circumference <3 standard deviations	Limited to coverage of the national surveillance network
González Y, 2012	To report congenital anomalies in 2012	Colombia	Routine data from epidemiologic surveillance	2012	Births	676,835	Head circumference <3 standard deviations	Limited to coverage of the national surveillance network
Misnaza SP, 2013	To report congenital anomalies in 2013	Colombia	Routine data from epidemiologic surveillance	2013	Births	658,835	Head circumference <3 standard deviations	Limited to coverage of the national surveillance network
Pachajoa H, 2010	To evaluate birth defects in a tertiary care hospital	Cali, Colombia	Observational – Cross sectional	2004-2008	Births	32,995	Head circumference <3 standard deviations	Small sample size
Silva JR, 1998	To evaluate congenital malformations and genetics in a newborn population	Barranquilla, Colombia	Observational – Cross sectional	1987-1988	Live births	3,763	Head circumference <3 standard deviations	Small sample size
Ramírez J, 2015	To evaluate birth defects in a tertiary care hospital	Cali, Colombia	Observational – Cross sectional	July, 2011-June, 2012	Births	5,669	Head circumference <3 standard deviations	Small sample size
López JS, 2015	To evaluate microcephaly in ECLAMC and in Brazil	Colombia	Observational – Case control	1982-2013	Births	249,746	Head circumference <3 standard deviations	Limited to coverage of the national surveillance network
García H, 2003	To evaluate the prevalence of congenital anomalies at the *Instituto Materno-Infantil de Bogotá*	Bogotá, Colombia	Observational – Cross sectional	October, 1997-April, 1998, July, 2000-November, 2000	Births	5,686	Head circumference <3 standard deviations	Study performed during a discontinuous time period
Porras GL, 2016	To determine the prevalence of congenital defects	Risaralda, Colombia	Observational – Cross sectional	July, 2010-December, 2013	Births	42,431	Head circumference <3 standard deviations	Small sample size
Zarante I, 2010	To determine the prevalence of congenital malformations and assess the prognosis of newborns	Bogotá, Ubaté, and Manizales, Colombia	Observational – Cross sectional	April, 2011-January, 2008	Births	52,744	Head circumference <3 standard deviations	Small sample size
Arteaga CE, 2003	To assess the prevalence and factors associated with congenital anomalies at the *Instituto Materno-Infantil de Bogotá*	Bogotá, Colombia	Observational – Cross sectional	1991-1992	Births	9,224	Head circumference <3 standard deviations	Small sample size

3.5 per 10,000 births in 2003. In the period of study, the rate of central nervous system defects in Colombia ranged from 2 to 8.7, with microcephaly ranging from 0.3 to 3.1 per 10,000 births. On average, the prevalence of these defects and microcephaly was 23.5 (95% CI 23.1-24) and 1.8 (95% CI 1.7-1.8) per 10,000 births, respectively. The study that reported the highest prevalence for microcephaly in the country was by ECLAMC during the period 1982-2013. In this study, 24,976 births were reported, of which 77 were registered with microcephaly, leading to a prevalence of 3.08 per 10,000 births for the follow-up period (table 2).

Discussion

Congenital defects are a worldwide public health problem. It is estimated that 7.9 million children are born with congenital defects every year, with 3.3 million children under 5 years of age dying due to these defects and 3.2 million surviving with disabilities (24). As a cause of infant death in Colombia in recent decades, congenital anomalies ranked seventh in 1970, fourth in 1980 and third in 1994 (25). From 2000 to 2004, a total of 14,036 deaths from congenital anomalies was reported in Colombia, with a mortality rate of 8.43 per 10,000 births (26). From 2005 to 2011, congenital defects were reported as the second leading cause of death in children under one year of age, contributing to 20.8% of all deaths, according to the *Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas* (DANE) (27). According to the analysis of the health situation in Colombia, congenital defects are the second leading cause of infant mortality. The available evidence suggests that the prevalence and the potential burden of congenital disorders in public health are high in developing countries and, in some circumstances, they are greater than in developed countries. Birth defects in Colombia are responsible for 23% of the total mortality in children under 5 years of age (28), a clinically significant issue that has been declared a public health problem (29).

After the ZV outbreak in the Americas, birth defects such as microcephaly have gained particular clinical relevance. Before the epidemic, the definition of microcephaly was heterogeneous, controversial, and varied between institutions (30). Some authors classify microcephaly as a head circumference less than two standard deviations from median values (31). Other authors suggest that this measure should be necessarily adjusted to prematurity and to the length of patients' head circumference (9,32). Assuming that the cephalic perimeter has a normal distribution across the population, 2.3% of all children would be defined as having microcephaly. Despite this, literature estimates that less than 0.54% to 0.56% of children are classified with a head circumference less than two standard deviations, which suggests a non-normal distribution of this measure (9). The true number of cases of microcephaly in Brazil, where the ZV epidemic was first associated with the condition, was unknown since this event was overestimated, no active search was done, and its diagnosis was based on non-standardized criteria before the associations between Zika and congenital defects (30).

We conducted a systematic review of the literature regarding the frequency of microcephaly in Colombia. The objective was to determine the prevalence of microcephaly in the country before the ZV epidemic and to establish whether there was a change in the prevalence of microcephaly per 10,000 births. Such information would allow us to determine if the increase of microcephaly cases was significant and develop a better approach to the Zika virus epidemic in Colombia and its association with congenital defects.

During the study period, microcephaly was equivalent to 3.38% of congenital defects and its prevalence rate fluctuated between 0.3 to 3.1 per 10,000 live births, with an average rate of 1, 56 per 10,000 live births from 1982 to 2013. Compared with the rate of microcephaly in the rest of Latin American countries, Colombia's rate falls within the average since ECLAMC rate per 10, 000 live births was 4.53 (95% CI 4.05-5.02) in Brazil and 4.30 (95% CI 2.57-3.22) in Chile, compared with 3.08 per 10,000 live births (95% CI 2.04-3.84), which does not surpass the global rate of microcephaly according to ECLAMC, which was 3.30 (95% CI 3.09-3.50) per 10,000 live births between 1982 and 2013. According to ECLAMC, from 1982 to 2013, Brazil and Chile had the highest prevalence of microcephaly in Latin America (33).

In the study period, few Colombian departments and cities had surveillance systems for reporting birth defects such as microcephaly. Among the studies found in literature, microcephaly, defined as a head circumference less than three standard deviations when adjusted for age and sex, we found those from Cali, Barranquilla, Bogotá, Risaralda, Manizales, and Ubaté. Besides these studies, microcephaly had also been reported in articles assessing birth defects across Colombia.

This relatively small amount of reporting on microcephaly could be explained by the low frequency of the event, which leads to its exclusion in the final statistics. Nevertheless, the number of reports of congenital malformations has increased in recent years, as noted in the annual report of Sivigila, which may be explained by an increase in reporting or an increase in the rate of microcephaly. We were unable to make this distinction in the present study, which represents a limitation.

Compared to the prevalence of microcephaly reported by ECLAMC from 1982 to 2013, the prevalence reported by Sivigila from 2010 to 2013 was lower, with an average prevalence of 1.5 births with microcephaly per 10,000 births. The studies reported and included in this review only classified the defects and described the frequency of microcephaly, but did not discriminate according to etiology. In the present review, we could not find any observational cohort studies or case-control studies evaluating the risks and other measures of association of microcephaly in Colombia. However, the different cross-sectional studies reported in the country confirmed the existence of microcephaly before the emergence of autochthonous ZV in the country.

One limitation of this study was the variability of the diagnostic criteria of microcephaly. We used the more rigorous criteria, that of less than three standard deviations of head circumference, adjusted for age and sex. Consequently, studies using other criteria for microcephaly were not included. Additionally, it is possible that not all relevant studies were found and included in the review, although we adopted measures to reduce the likelihood of this limitation.

Finally, the prevalence of microcephaly in Colombia from 1982 to 2013, before the introduction of ZV, ranged from 0.3 to 3.1 per 10,000 births, with an average of 1.8 (95% CI 1.7 - 1.8) per 10,000 births. These findings are important to determine if the prevalence after the introduction of the Zika virus has meant significant changes.

Funding

There was no funding source for this study.

Acknowledgements

To Universidad Icesi, Fundación Valle del Lili, and the Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) for their continued collaboration on this work.

References

1. **Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.** Protocolo de Vigilancia en Salud Pública: defectos congénitos. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2014.
2. **Ashwal S, Michelson D, Plawner L, Dobyns WB, Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society.** Practice parameter: Evaluation of the child with microcephaly (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. Neurology. 2009;73:887-97. https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181b783f7
3. **World Health Organization.** Screening, assessment and management of neonates and infants with complications associated with Zika virus exposure in utero. Geneva: World Health Organization; 2016.
4. **Jaworski M, Hersh JH, Donat J, Shearer LT, Weisskopf B.** Computed tomography of the head in the evaluation of microcephaly. Pediatrics. 1986;78:1064-9.
5. **Steinlin M, Zürrer M, Martin E, Boesch C, Largo RH, Boltshauser E.** Contribution of magnetic resonance imaging in the evaluation of microcephaly. Neuropediatrics. 1991;22:184-9. https://doi.org/10.1055/s-2008-1071438
6. **Sugimoto T, Yasuhara A, Nishida N, Murakami K, Woo M, Kobayashi Y.** MRI of the head in the evaluation of microcephaly. Neuropediatrics. 1993;24:4-7. https://doi.org/10.1055/s-2008-1071504
7. **Opitz JM, Holt MC.** Microcephaly: General considerations and aids to nosology. J Craniofac Genet Dev Biol. 1990;10:175-204.
8. **Stoll C.** Problems in the diagnosis of fragile X syndrome in young children are still present. Am J Med Genet. 2001; 100:110-5. https://doi.org/10.1002/1096-8628(20010422)100:2<110::AID-AJMG1242>3.0.CO;2-I
9. **Dolk H.** The predictive value of microcephaly during the first year of life for mental retardation at seven years. Dev Med Child Neurol. 1991;33:974-83. https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.1991.tb14813.x
10. **Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR.** Zika virus and birth defects--reviewing the evidence for causality. N Engl J Med. 2016;374:1981-7. https://doi.org/10.1056/NEJMsr1604338
11. **Mysorekar IU, Diamond MS.** Modeling Zika virus infection in pregnancy. N Engl J Med. 2016;375:481-4. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.008
12. **Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, *et al*.** Zika virus associated with microcephaly. N Engl J Med. 2016;374:951-8. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1600651
13. **Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, Horovitz DD, Cavalcanti DP, Pessoa A, *et al*.** Possible association between zika virus infection and microcephaly - Brazil, 2015. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2016;65:59-62. https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e2
14. **World Health Organization.** Disease outbreak news. Microcephaly-Brazil. 2016;91:237-48. Accessed: June 22, 2018. Available at: http://www.who.int/wer/2016/wer9118/en/

15. **World Health Organization.** Microcephaly – Brazil. Weekly Epidemiological Record. Accessed: June 22, 2018. Available at: http://www.who.int/csr/don/8-january-2016-brazil-microcephaly/en/

16. **Gulland A.** Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. BMJ. 2016;352:i657. https://doi.org/10.1136/bmj.i657

17. **Fauci AS, Morens DM.** Zika virus in the Americas — yet another arbovirus threat. N Engl J Med. 2016;374:601-4. https://doi.org/10.1056/NEJMp1600297

18. **Rubin EJ, Greene MF, Baden LR.** Zika virus and microcephaly. N Engl J Med. 2016;374:984-5. https://doi.org/10.1056/NEJMe1601862

19. **Kumar A, Singh HN, Pareek V, Raza K, Dantham S, Kumar P, *et al*.** A possible mechanism of Zika virus associated microcephaly: Imperative Role of Retinoic Acid Response Element (RARE) Consensus Sequence Repeats in the Viral Genome. Front Hum Neurosci. 2016;10:403. https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00403

20. **Mawson AR.** Pathogenesis of Zika virus-associated embryopathy. Biores Open Access. 2016;5:171-6. https://doi.org/10.1089/biores.2016.0004

21. **Huang W-C, Abraham R, Shim B-S, Choe H, Page DT.** Zika virus infection during the period of maximal brain growth causes microcephaly and corticospinal neuron apoptosis in wild type mice. Sci Rep. 2016;6:34793. https://doi.org/10.1038/srep34793

22. **Pacheco O, Beltrán M, Nelson CA, Valencia D, Tolosa N, Farr SL, *et al*.** Zika virus disease in Colombia - preliminary report. N Engl J Med. 2016. p. 1-10. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1604037

23. **Porras GL, León OM, Molano J, Quiceno SL, Pachajoa H, Montoya JJ.** Prevalencia de defectos congénitos en Risaralda, 2010-2013. Biomédica. 2016;36:556-63. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i4.2771

24. **Carmona RH.** The global challenges of birth defects and disabilities. Lancet. 2005;366:1142-4. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67459-4

25. **Medina MR.** Geografía de la mortalidad infantil en Colombia, 1985-1994. Bogotá: Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE); 1999.

26. **González Y.** Informe final del evento anomalías congénitas hasta el periodo epidemiológico 13 del año 2012. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2012.

27. **Observatorio Nacional de Salud.** Tercer informe ONS: Mortalidad evitable en Colombia para 1998-2011. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2014.

28. **Organización Mundial de la Salud.** Estadísticas sanitarias mundiales, 2014. Geneva: Organización Mundial de la Salud; 2014. p. 13-22.

29. **García H, Salguero GA, Moreno J, Arteaga C, Giraldo A.** Frecuencia de anomalías congénitas en el Instituto Materno-Infantil, Bogotá. Biomédica. 2003;23:161-72. https://doi.org/10.7705/biomedica.v23i2.1208

30. **Victora CG, Schuler-Faccini L, Matijasevich A, Ribeiro E, Pessoa A, Barros FC.** Microcephaly in Brazil: How to interpret reported numbers? Lancet. 2016;387:621-4. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00273-7

31. **Boom JA.** Microcephaly in infants and children: Etiology and evaluation. Accessed on: June 22, 2018. Available at: https://www.uptodate.com/contents/microcephaly-in-infants-and-children-etiology-and-evaluation

32. **Roche AF, Mukherjee D, Guo SM, Moore WM.** Head circumference reference data: Birth to 18 years. Pediatrics. 1987;79:706-12.

33. **Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas.** Microcefalia no ECLAMC e no Brasil. Buenos Aires: Estudio Colaborativo Latino-Americano de Malformaciones Congénitas; 2015.

Biomédica 2018;38:135-43
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3997

BRIEF COMMUNICATION

Nuclei ultrastructural changes of C6/36 cells infected with virus dengue type 2

Jorge Rivera[1], Aura Caterine Rengifo[1], Ladys Sarmiento[1], Taylor Díaz[1], Katherine Laiton-Donato[2], Martha Gracia[2], Sigrid Camacho[3], Myriam Velandia-Romero[3], Jaime Castellanos[3], María Leonor Caldas[1]

[1] Grupo de Morfología Celular, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Grupo de Virología, Dirección Red Nacional de Laboratorios, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia
[3] Grupo de Virología, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

Introduction: Dengue virus replication has been considered mainly cytoplasmic, however, studies indicate that some flaviviruses may use the intranuclear pathway as part of the machinery that the virus uses to increase infection capacity in the host cell. This paper describes alterations at nuclear level in the cell infected with dengue, which are likely involved in the virus replication processes.
Objective: This paper addresses the ultrastructural observations of C6/36 cells of the *Aedes albopictus* mosquito infected with dengue virus type 2.
Materials and methods: C6/36 cells were infected in culture medium with the serum of a patient positively diagnosed for dengue 2. Subsequently, the cells were incubated for 10 days and the cytopathic effect was assessed. The cells were processed for immunofluorescence assays and transmission electron microscopy.
Results: The immunofluorescence assays confirmed the presence of viral protein E associated with cellular syncytia in the culture. In the ultrastructural study, the infected cells showed vesicular-tubular structures and dilated cisterns of the endoplasmic reticulum at the cytoplasmic level. Viral particles were found exclusively in cytoplasm localized within the vacuoles. Nuclei of cellular syncytia showed membrane structures arranged in a circular shape and, in some cases, these syncytia displayed lysis; in no case viral particles were observed at the nuclear level.
Conclusions: The ultrastructural alterations of nuclei in cells infected with the dengue virus using electron microscopy techniques had not been reported before, as far as we know. It is likely that such modifications are associated with replicative processes at an intranuclear level as an alternate replication mechanism.

Key words: *Aedes*; dengue; microscopy, electron.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3997

Cambios ultraestructurales en núcleos de células C6/36 infectadas con virus dengue de tipo 2

Introducción. La replicación del virus del dengue se ha considerado principalmente citoplásmica; sin embargo, en diversos estudios se ha informado que algunos flavivirus pueden utilizar factores intranucleares como parte de la maquinaria que utilizan para aumentar la capacidad de infección en la célula huésped. En este trabajo se describen las alteraciones a nivel nuclear en células infectadas con dengue, probablemente involucradas en procesos de replicación viral.
Objetivo. Presentar las observaciones ultraestructurales de células C6/36 de *Aedes albopictus* infectadas con el virus del dengue de tipo 2.
Materiales y métodos. Se infectaron células C6/36 con suero de un paciente con diagnóstico de dengue 2; posteriormente, se mantuvieron en medio de cultivo durante 10 días y se evaluó el efecto citopático. Las células se procesaron para los ensayos de inmunofluorescencia y microscopía electrónica de transmisión, con el fin de hacer el estudio ultraestructural.

Author's contributions:
Jorge Rivera: Design of immunofluorescence assays, cell processing for electron microscopy, analysis of results and writing of the manuscript
Aura Caterine Rengifo: Design of immunofluorescence assays, analysis of results and writing of the manuscript
Ladys Sarmiento: Ultrastructural study of infected cells
Taylor Díaz: Cell processing for high-resolution optical microscopy
Katherine Laiton: Virus inoculation and cell culture
Martha Gracia: Isolation of viral strain from patient serum
Sigrid Camacho: Immunofluorescence assays
Myriam Velandia and Jaime Castellanos: Counselling and interpretation of immunofluorescence assays
María Leonor Caldas: Design of ultrastructural study in infected cells

Resultados. Los ensayos de inmunofluorescencia confirmaron la presencia de la proteína E viral asociada con sincitios celulares en el cultivo. En el estudio ultraestructural, las células infectadas tenían estructuras vesiculares y tubulares, y cisternas dilatadas del retículo endoplásmico en el citoplasma. Las partículas virales se encontraron exclusivamente en vacuolas localizadas en el citoplasma. Los núcleos de los sincitios celulares contenían estructuras de membrana dispuestas en forma circular y, en algunos casos, dichos sincitios presentaban lisis. En ningún caso se observaron partículas virales en el núcleo.

Conclusiones. No se habían reportado alteraciones ultraestructurales en los núcleos de células infectadas con el virus del dengue detectadas mediante técnicas de microscopia electrónica. Es probable que tales modificaciones estén asociadas con procesos intranucleares de replicación como un mecanismo alternativo.

Palabras clave: *Aedes*; dengue; microscopía electrónica.

doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3997

Dengue virus (DENV) belongs to the *Flavivirus* genus of the Flaviviridae family; this arbovirus possesses four antigenically distinct serotypes and is transmitted to humans through vectors of the *Aedes* genus, specifically *A. aegypti* and *A. albopictus* (1,2). The infection in humans causes a febrile illness limited in most of the cases and it can even be asymptomatic; however, in a small proportion, it generates a lethal infection characterized by hemorrhagic manifestations, hepatic dysfunction, respiratory difficulty, increased vascular permeability and multiple organ failure (3-5).

The viral particle has a size of 40 to 50 nm and is comprised by a wrapped capsid containing a single positive-polarity RNA genome of an approximate size of 11 kb. The genome codifies a polyprotein that contains three structural proteins (C, prM, and E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5); it has an open reading frame and is flanked by two untranslated regions that have secondary structures required for efficient translation and replication (6,7).

In pathogenesis studies of the arboviral dengue infection, one of the main objectives is to determine the mechanisms through which the virus replicates in the host cell. The viral replication of dengue has been associated mainly to the cytoplasmic level; however, some authors report intranuclear replication due to the presence of nonstructural proteins or their domains in this cellular organelle (8). *In vitro*, DENV has shown to be capable of infecting numerous human cells, including dendritic cells (DC), monocytes and macrophages, B cells, T cells, endothelial cells, hepatocytes, and neuronal cells, as well as a number of cell lines used for viral propagation such as Vero cells or C6/36 cells (9).

The latter cells of *A. albopictus* mosquito were established in 1978 and, since then, thanks to the non-complex nature of the culture conditions, it has been possible to isolate and identify other arboviruses (10,11); similarly, thanks to the ultrastructural study of the dengue viral infection in this type of cell, some morphological aspects that occur during the infection and replication processes have been elucidated, allowing to expand the knowledge on the pathogenesis of the dengue infection (12-14).

This paper presents an ultrastructural characterization of C6/36 cells infected with the dengue virus type 2 and, for the first time, alterations at the nuclear level that could be involved in the virus replication processes.

Materials and methods

Cell cultures and infection

C6/36 cells of *A. albopictus* (*Aa* C6/36) from the cell bank of the *Grupo de Virología* at the *Instituto Nacional de Salud* in Bogotá were infected with dengue virus type 2 (DENV-2).

Briefly, the *Aa* C6/36 cells were thawed with thawing medium (E-MEM-Gibco™, fetal bovine serum 20%, tryptose phosphate 3%, penicillin-streptomycin 2%, glutamine 1%, Hepes 1%, and bicarbonate 1%) were seeded and incubated during three days at 28°C in tubes until obtaining 80% of confluent layer. After removing the medium, the cells were incubated for 30 minutes at 28°C with a serum from patients with a positive diagnosis for dengue 2 in a 1:9 ratio in culture medium, and were subsequently incubated for 10 days in maintenance

Corresponding author:
Jorge Alonso Rivera, Grupo de Morfología Celular, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N° 51-20, CAN, Bogotá, D.C., Colombia
Telephone: 220 7700, extension 1262
jrivera@ins.gov.co

Received: 01/08/17; accepted: 17/05/18

culture medium following the viral isolation protocols established by the *Grupo de Virología* of the *Instituto Nacional de Salud*. The viral titer was 4.00 x 10^6 PFU/ml obtained after passage in C6/36 cells. Finally, the cytopathic effect was assessed using light microscopy and the cell pellet obtained was rinsed with phosphate buffered saline.

Immunofluorescence for the confirmation of the viral infection

The viral infection was confirmed by detecting viral antigens with indirect immunofluorescence using an antibody against the protein E of the virus. Of the cell pellet obtained in the culture, 10 µl were taken and spread on a slide, and subsequently, they were fixed with 10% acetone for 10 minutes and stored at -70 °C until processing. The cells were permeated with Triton™ X-100 at 0.3% for 1 hour; after rinsing, blocking was performed using normal 10% goat serum for 1 hour followed by incubation overnight at 4 °C with the MAB8744 antibody (E protein of *Flavivirus*, Chemicon) in a 1:50 dilution. Later, they were incubated with anti-mice IgG marked with Alexa 488 in a 1:200 dilution for 1 hour using DAPI with nuclei contrast. Finally, the slides were mounted with VectaShield (Vector) and observed under the Leica TCSSP5™ confocal microscope.

Transmission Electron Microscopy

Infected and normal cells were processed separately with two fixators, i.e., tannic acid 4% and glutaraldehyde 2.5% in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.2 and ruthenium red 1% in sodium cacodylate buffer; subsequently, the two treatments were fixed with aqueous osmium tetraoxide at 2%. The dehydration process was performed in ascending ethanolic gradient from 50 to 70 to 80% for 10 minutes each, to 95% for 20 minutes and two changes of ethanol at 100% for 20 minutes, to then pass the cells through propylene oxide twice for 20 minutes each. The infiltration was performed in a mixture of propylene oxide and araldite-Epon™ epoxy resin (2:1) for 1 hour, 1:1 for one hour, and then two changes of pure resin in 24 hours; finally, the polymerization was performed at 68 °C for 48 hours.

We obtained semi-fine sections from the cells included in resin of approximately 500 nm, which were stained with toluidine blue; then we contrasted sections of 60 to 90 nm thick with uranyl acetate and lead citrate and the sections were observed under a transmission electron microscope (ZEISS EM 109™).

Image digitalization for light microscopy was performed in an Axiophot Zeiss™ microscope with an Evolution VF™ camera and QCapture Pro 6.0™ software; for immunofluorescence images we used the Leica TCSSP5™ confocal microscope and the ZEN 2012™ Zeiss program and for electron microscopy, the Zeiss EM 109™ electron microscope and a Finger Lakes Instrumentations™ camera with MaxIm DL™ software.

Ethical considerations

Viral isolates were obtained from the sera of patients diagnosed by positive PCR for dengue virus from the samples archive of the *Grupo de Virología* of the *Instituto Nacional de Salud*. The information of the cases selected was treated following the basic ethical principles promulgated in the Declaration of Helsinki adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964 (15).

Results

During the confirmation process by immunofluorescence of the viral infection in the C6/36 cells to detect the E protein of the virus, we observed a cytoplasmic localization of the protein, mainly in cell syncytia (figure 1).

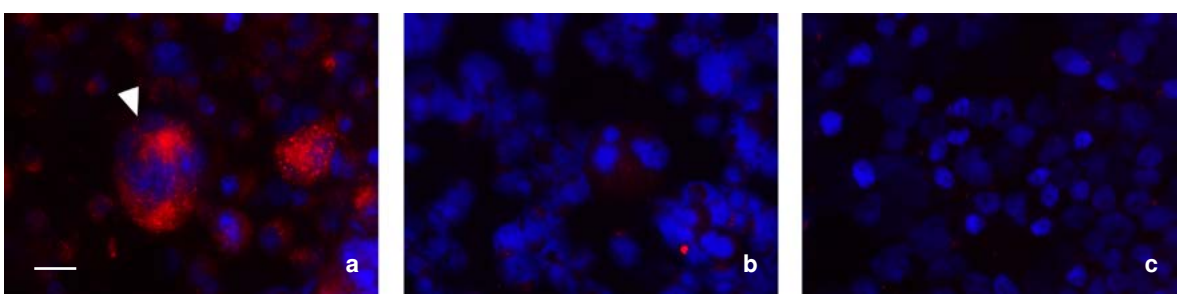

Figure 1. C6/36 cells of *Aedes albopictus.* Immunofluorescence to detect E protein of flavivirus (MAB8744, Chemicon). **a.** Cells infected with dengue virus DENV-2, the arrowhead indicates a cell syncytium. **b.** Negative control of the immunofluorescence assay. **c.** Mock cells. DAPI was used for nuclei contrast. The localization of the antigen in **a**, was exclusively cytoplasmic. Bar: 10 µm

Using high-resolution optical microscopy to observe the infected C6/36 cells, we also observed a prominent vacuolization at the cytoplasmic level and the formation of cellular syncytia, a typical cytopathic effect of this cell line (figure 2) (14,16).

We also observed cytoplasmic vesicular-tubular structures and dilated cisterns of the endoplasmic reticulum during the ultrastructural study of the infected cells (figure 3). Viral particles with an approximate size of 70 nm were observed exclusively in the cytoplasm, specifically within the cytoplasmic vacuoles, which showed an arrangement in groups of particles when observed with a higher contrast (figure 3, b and c). In the syncytia nuclei circularly arranged, we observed membrane structures (figures 4 and 5), and, additionally, lysed syncytia whose nuclei have the same structures; no viral particles were observed at nuclear level; in uninfected cells, no alterations were observed (figures 2c and 6).

Discussion

The structural alterations we observed, such as the formation of vesicular-tubular structures, dilated endoplasmic reticulum cisterns, membrane structures at cytoplasmic level –in some cases in crystal arrangements–, and viral particles in cytoplasmic vesicles, have been previously reported in infected C6/36 cells and in other cell types (13,17-20). The prominent vacuolization observed in the infected cells is associated to a cytopathic effect, also demonstrated in other cell lines such as HepG2, Vero,

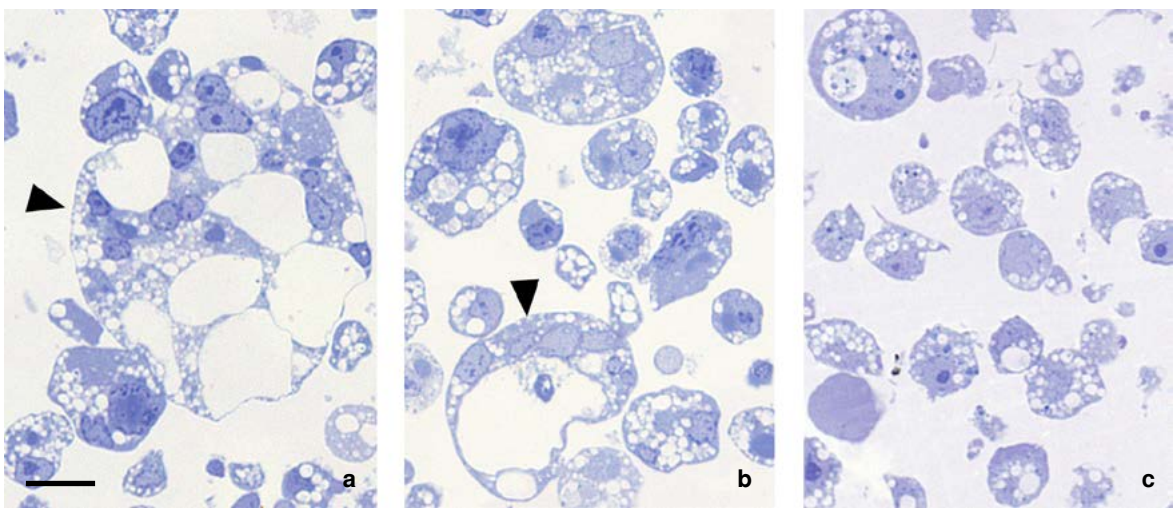

Figure 2. Formation of cellular syncytia in C6/36 mosquito cells observed by high-resolution optical microscopy. **a** and **b.** Cells infected with DENV-2; note the formation of cell syncytia and the prominent vacuolation at cytoplasmic level mainly in syncytia (arrowheads). **c.** Mock cells. Blue toluidine staining. Bar: 10 µm

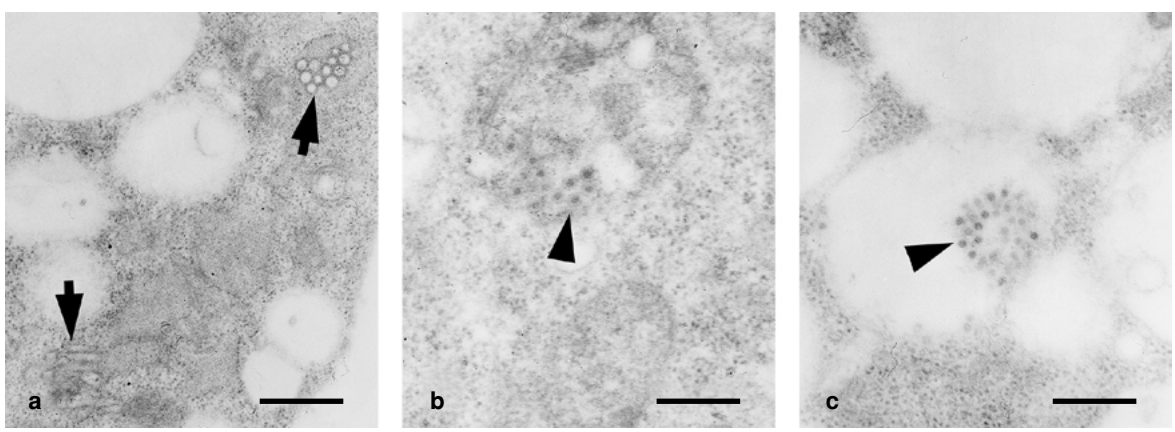

Figure 3. C6/36 cells infected with DENV-2 and fixed in ruthenium red 1%. **a.** Vesicular-tubular structures located in the cytoplasm (arrows). **b** and **c.** Viral particles observed at the cytoplasmic level (arrowheads). Bar: a: 520 nm, b and c: 325 nm

BHK, and LLC-MK (21-24), which occurs usually in cell cultures with prolonged periods of dengue infection. These alterations have been reported in cultures with 5 to 7 days of infection, in which vacuolization and syncytia formation is observed with the abundant presence of viral particles (13). However, the membrane arrangements observed at nuclear level had not been reported so far for dengue virus type 2 infection in C6/36 cells (figure 5). These findings can be associated with the viral infection as apoptosis has been previously reported in this same cell type in models treated with heavy metals; however, different morphological findings have been described such as eccentric nuclei and lysosomes randomly distributed in the cytoplasm (25).

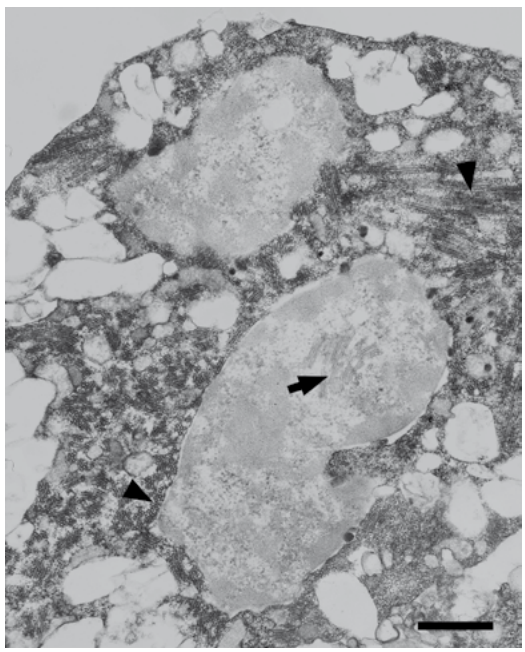

Figure 4. Cellular syncytia in C6/36 mosquito cells observed by Transmission Electron Microscopy. Membrane structures located in the cytoplasm of cells infected with Denv-2 (arrows) and in a nucleus belonging to a cell syncytium (arrowhead). Fixation in tannic acid 4%-glutaraldehyde 2.5%. Bar: 0.6 µm, approximately

The membrane structures induced by the virus have been related to the replication factories that provide a platform to transport proteins and viral genomes between the sites of the RNA replication (26-29). Therefore, it is possible that the structures observed in the nucleus in this study are connected to the replication events of the virus at the nuclear level. However, this type of replication has traditionally been considered as the domain of the retroviruses, such as the herpes-virus, the adenoviruses and the orthomyxoviruses which have a genome composed of DNA and RNA, respectively, and use the nucleus as a site for viral replication.

Other viruses whose replication cycle involves the nucleus are some mononegavirals such as the Borna's disease virus and some rhabdoviruses in insects (30). In the case of viruses with RNA genome and positive polarity, as is the case of the dengue virus, replication is believed to be exclusively cytoplasmic. Even so, many of the viruses that use the host cytoplasm as a primary site for viral replication involve in this process either the nucleus or its components by hijacking nuclear factors and altering the cytoplasm-nucleus traffic to promote viral replication (31). In the case of some flaviviruses, it has been demonstrated that they involve the nucleus in their replication, at least indirectly. For example, the treatment of host cells with actinomycin D or alpha-amanitine prior to the viral infection involves the viral replication

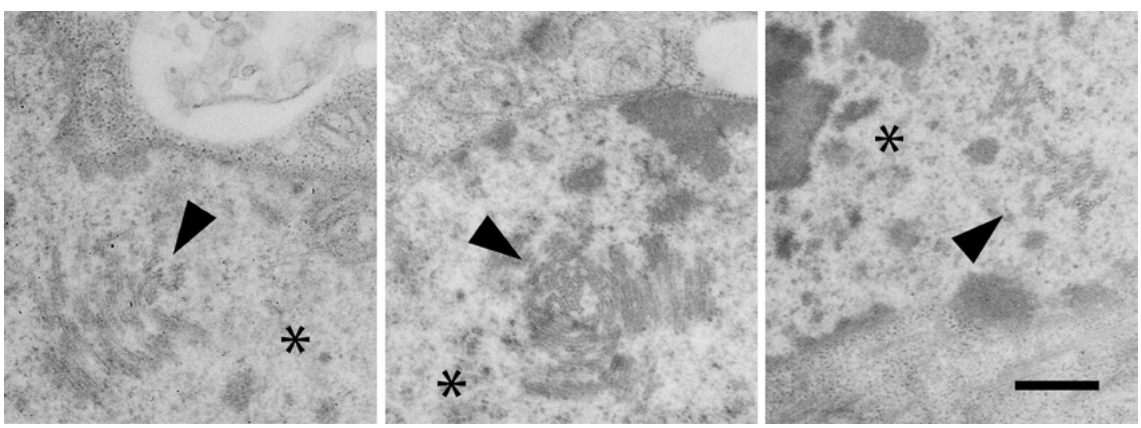

Figure 5. Nuclei of C6/36 cells infected with Denv-2. Membrane structures located in nuclei (arrowheads). The asterisk indicates the nuclear area. Fixation in ruthenium red 1%. Bar: 360 nm

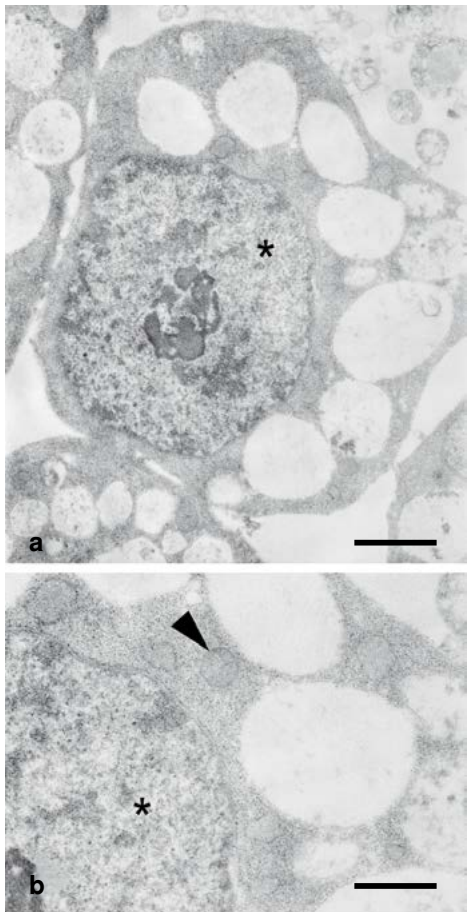

Figure 6. Uninfected C6/36 cells. **a.** The asterisk indicates the nuclear area. **b.** Amplification of **a**., mitochondria (arrowheads). Fixation in ruthenium red 1%. Bar: a: 1.5 µm, b: 0.6 µm approximately

and, subsequently, the viral titers (32,33). The cell enucleation during the latent period of the viral infection also inhibits the replication of the Japanese encephalitis virus (JEV) (34,35).

Although it is not clear if the virus replication can take place in the nucleus, it has been demonstrated that various viral proteins involved in this process are located in the nucleus. For example, there is evidence of the transportation towards the nucleus of the flavivirus and picornavirus RNA-dependent polymerase (RdRP) (36,37); moreover, in the Japanese encephalitis, West Nile, dengue, and yellow fever viruses, this polymerase migrates to the nucleus and, in some cases, a significant proportion of its activity resides in the nucleus (34,36,37). A high nuclear immunoreactivity has been reported for the NS5 protein in the dengue virus, and somewhat lower in types 1 and 2 (38), although its function in the nucleus is not clear.

Some structural proteins of the virus have been located in the nucleus. It is known that the structural protein C contains three nuclear localization signals (NLS) (39,40) and although it has been demonstrated that the said localization is not required for viral proliferation (39), there is evidence suggesting that it interacts with a transcription repressor in the DAXX nucleus (41). In the case of the Zika virus, analyses have shown that a monoclonal antibody that recognizes an E protein epitope localizes in the nucleolus. It has been suggested that the localization of the antigen can be part of a polyprotein precursor synthesized before the maturation of the virus and is transported from the cytoplasm to the nucleus in an early stage of the infection cycle (42).

In the case of membrane structures, one of the viral proteins involved in the formation of these intracellular sources is protein NS4B of the hepatitis C virus; however, in the case of the dengue virus, it is unknown if such protein fulfills the same function (43). On the contrary, there is evidence that the individual manifestation of NS4A in dengue viruses lacking the 2K fragment results in the induction of membrane alterations similar to the structures induced by infection with the virus (44).

This paper reports changes in the ultrastructural morphology of C6/36 cells infected with the dengue virus. We observed a prominent vacuolization, as well as the formation of syncytia and tubular vesicle structures containing viral particles at the cytoplasmic level. We report the presence of membrane structures located at the nuclear level, which are probably involved in the replication processes according to previous reports. There are few reports of the inclusion of the dengue virus at the nuclear level, but the presence of glycogen-associated inclusions was recently demonstrated in fatal cases caused by dengue infection and in a murine model of infection with hepatitis C virus (45,46).

The cultures analyzed in this study are prolonged infection cultures (10 days of infection), so it is possible that the structures observed at the nuclear level may be an effect that occurs in the infection after several cycles of viral replication. Until now, only cultures with post-infection times of up to 72 hours have been assessed, as shown in table 1, and, therefore, it is possible that such findings have gone unnoticed. Our results point to the need of conducting further studies aimed at establishing the mechanisms used by the virus to perform its

Table 1. Report of nuclear localization of dengue virus antigens

Viral serotype DENV	Cell line	Time post-infection	Reference
DENV-2 (NS5)	Vero, BHK21	Up to 72 h	Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 through its importin a/b-recognized nuclear localization sequences is integral to viral infection (47).
DENV-2 (NS5).	CV-1 Monkey kidney	36-48 h	Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5 (36).
DENV-2 NGC (NS5)	Huh7, BHK-21, Vero, Hep G2, A549, C6/36	24 h	Nuclear localization of dengue virus non-structural protein 5 does not strictly correlate with efficient viral RNA replication and inhibition of type I interferon signaling (8).
DENV-2 NGC (NS1)	Human monocytes THP-1	24 h	Dengue virus non-structural 1 protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H in human monocytic cells (48).
DENV-2 (NS5)	C6/36 *Aedes albopictus*	48 h	Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells (18)
DENV-4 (C). DENV-1 (C).	BHK-21. LLC-MK2. Vero, C6/36	24 h (DENV4). 6-7 h (DENV-1)	Detection of dengue 4 virus core protein in the nucleus A monoclonal antibody to dengue 4 virus reacts with the antigen in the nucleus and cytoplasm (49).
DENV-2 (C) DENV-4 (C)	BHK-21., LLC – MK2 Vero, C6/36	24 h 6-7 h	Nuclear localization of dengue 2 virus core protein detected with monoclonal antibodies (50)
DENV-2 (C)	BHK-21	6-24 h	Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus (40)
DENV-2 (C)	PS, Vero, C6/36	48 h	Multiple regions in dengue virus capsid protein contribute to nuclear localization during virus infection (39).

replication in the host cell. Additional assays will be required to demonstrate or reject the direct involvement of the membrane structures at the nucleus in replication events in this cell organelle.

Acknowledgements

We thank the *Dirección de Investigación en Salud Pública* and the *Dirección de la Red Nacional de Laboratorios* of the *Instituto Nacional de Salud*, as well as the *Laboratorio de Virología* of the *Universidad El Bosque*.

Conflicts of interest

The authors of this study hereby declare that no conflicts of interest exist.

Financing

This work received funds from project CTIN 24-2015 endorsed by the *Instituto Nacional de Salud*, and of the *Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación*, Colciencias, contract 757-13.

References

1. **Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, *et al.*** Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. J Gen Virol. 1989;70:37-43. https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-1-37
2. **del Ángel RM**. Entrada del virus del dengue: moléculas que pueden modular la patogenia viral. Cinvestad. 2006; 25:38-43.
3. **Nascimento D, Castro AR, Froes IB, Bigaton G, Oliveira EC, Dal Fabbro MF, *et al.*** Clinical and laboratory findings in patients with dengue associated with hepatopathy. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44:674-7. https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000061
4. **Seneviratne SL, Malavige GN, de Silva HJ.** Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006;100:608-14. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.10.007
5. **Ling LM, Wilder-Smith A, Leo YS.** Fulminant hepatitis in dengue haemorrhagic fever. J Clin Virol. 2007;38:265-8. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.12.011
6. **Bartenschlager R, Miller S.** Molecular aspects of dengue virus replication. Future Microbiol. 2008;3:155-65. https://doi.org/10.2217/17460913.3.2.155
7. **Gubler DJ, Ooi EE, Vasudevan S, Farrar J.** Dengue and dengue hemorrhagic fever. Second edition. Singapore: CABI; 2014. p. 337. https://doi.org/10.1079/9781845939649.0000
8. **Kumar A, Buhler S, Selisko B, Davidson A, Mulder K, Canard B, *et al.*** Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 does not strictly correlate with efficient viral RNA replication and inhibition of type I interferon signaling. J Virol. 2013;87:4545-57. https://doi.org/10.1128/JVI.03083-12
9. **Clyde K, Kyle JL, Harris E.** Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. J Virol. 2006;80:11418-31. https://doi.org/10.1128/JVI.01257-06

10. **Figueiredo LT.** Uso de células de *Aedes albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Rhabdoviridae. Rev Soc Bras Med Trop.1990;23:13-8. https://doi.org/10.1590/S0037-86821990000100003

11. **Batista WC, Tavares Gda S, Vieira DS, Honda ER, Pereira SS, Tada MS.** Notification of the first isolation of Cacipacore virus in a human in the State of Rondonia, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44:528-30. https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000400028

12. **Grief C, Galler R, Cortés LM, Barth OM.** Intracellular localisation of dengue-2 RNA in mosquito cell culture using electron microscopic *in situ* hybridisation. Arch Virol. 1997;142:2347-57.

13. **Barth OM.** Replication of dengue viruses in mosquito cell cultures--A model from ultrastructural observations. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87:565-74. https://doi.org/10.1590/S0074-02761992000400017

14. **Castañeda NY, Castellanos JE, Zapata AC, Bello F.** Línea celular de *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) AEGY28 refractaria a la infección con los virus dengue 2 y fiebre amarilla. Acta Biológica Colombiana. 2007;12:47-58.

15. **World Health Organization.** Guidelines for good clinical practice (GCP) for trials on pharmaceutical products. WHO Technical Report Series. 1995;850:97-137.

16. **Barth OM, De Castro-Côrtes LM.** Morphology of dengue virus induced cell syncytia. Acta Microscopica. 1997;6:1-8.

17. **Ko KK, Igarashi A, Fukai K.** Electron microscopic observations on *Aedes albopictus* cells infected with dengue viruses. Arch Virol.1979;62:41-52.

18. **Junjhon J, Pennington JG, Edwards TJ, Perera R, Lanman J, Kuhn RJ.** Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. J Virol. 2014;88:4687-97. https://doi.org/10.1128/JVI.00118-14

19. **Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, *et al.*** Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. Cell Host Microbe. 2009;5:365-75. https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007

20. **Cardiff RD, Russ SB, Brandt WE, Russell PK.** Cytological localization of Dengue-2 antigens: An immunological study with ultrastructural correlation. Infect Immun.1973;7:809-16.

21. **Stohlman SA, Wisseman CL Jr., Eylar OR, Silverman DJ.** Dengue virus-induced modifications of host cell membranes. J Virol. 1975;16:1017-26.

22. **Marianneau P, Steffan AM, Royer C, Drouet MT, Kirn A, Deubel V.** Differing infection patterns of dengue and yellow fever viruses in a human hepatoma cell line. J Infect Dis. 1998;178:1270-8. https://doi.org/10.1086/314466

23. **Matsumura T, Stollar V, Schlesinger RW.** Studies on the nature of dengue viruses. V. Structure and development of dengue virus in Vero cells. Virology. 1971;46:344-55. https://doi.org/10.1016/0042-6822(71)90036-5

24. **Demsey A, Steere RL, Brandt WE, Veltri BJ.** Morphology and development of dengue-2 virus employing the freeze-fracture and thin-section techniques. J Ultrastruct Res. 1974;46:103-16.

25. **Raes H, Braeckman BP, Criel GR, Rzeznik U, Vanfleteren JR.** Copper induces apoptosis in *Aedes* C6/36 cells. J Exp Zool. 2000;286:1-12. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(20000101)286

26. **den Boon JA, Díaz A, Ahlquist P.** Cytoplasmic viral replication complexes. Cell Host Microbe. 2010;8:77-85. https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.010

27. **Salonen A, Ahola T, Kaariainen L.** Viral RNA replication in association with cellular membranes. Curr Top Microbiol Immunol. 2005;285:139-73.

28. **Miller S, Krijnse-Locker J.** Modification of intracellular membrane structures for virus replication. Nat Rev Microbiol. 2008;6:363-74. https://doi.org/10.1038/nrmicro1890

29. **Romero-Brey I, Bartenschlager R.** Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses. Viruses. 2014;6:2826-57. https://doi.org/10.3390/v6072826

30. **Whittaker GR, Kann M, Helenius A.** Viral entry into the nucleus. Annu Rev Cell Dev Biol. 2000;16:627-51. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.627

31. **Hiscox JA.** The interaction of animal cytoplasmic RNA viruses with the nucleus to facilitate replication. Virus Res. 2003;95:13-22. https://doi.org/10.1016/S0168-1702(03)00160-6

32. **Uchil PD, Satchidanandam V.** Characterization of RNA synthesis, replication mechanism, and in vitro RNA-dependent RNA polymerase activity of japanese encephalitis virus. Virology. 2003;307:358-71. https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00130-7

33. **Zebovitz E, Leong JK, Doughty SC.** Involvement of the host cell nuclear envelope membranes in the replication of Japanese encephalitis virus. Infect Immun. 1974;10:204-11.

34. **Uchil PD, Kumar AV, Satchidanandam V.** Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells. J Virol. 2006;80:5451-64. https://doi.org/10.1128/JVI.01982-05

35. **Kos KA, Osborne BA, Goldsby RA.** Inhibition of group B arbovirus antigen production and replication in cells enucleated with cytochalasin B. J Virol. 1975;15:913-7.

36. **Kapoor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusukawa J, Ebner KE, Padmanabhan R.** Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. J Biol Chem. 1995;270:19100-6. https://doi.org/10.1074/jbc.270.32.19100

37. **Weidman MK, Sharma R, Raychaudhuri S, Kundu P, Tsai W, Dasgupta A.** The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. Virus Res. 2003;95:75-85. https://doi.org/10.1016/S0168-1702(03)00164-3

38. **Tay MY, Fraser JE, Chan WK, Moreland NJ, Rathore AP, Wang C, *et al*.** Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1-4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin. Antiviral Res. 2013;99:301-6. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.002

39. **Sangiambut S, Keelapang P, Aaskov J, Puttikhunt C, Kasinrerk W, Malasit P, *et al.*** Multiple regions in dengue virus capsid protein contribute to nuclear localization during virus infection. J Gen Virol. 2008;89:1254-64. https://doi.org/10.1099/vir.0.83264-0

40. **Wang SH, Syu WJ, Huang KJ, Lei HY, Yao CW, King CC, *et al*.** Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus. J Gen Virol. 2002;83:3093-102. https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-3093

41. **Netsawang J, Noisakran S, Puttikhunt C, Kasinrerk W, Wongwiwat W, Malasit P, *et al.*** Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis. Virus Res. 2010;147:275-83. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.11.012

42. **Buckley A, Gould EA.** Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langat virus. J Gen Virol. 1988;69:1913-20. https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-8-1913

43. **Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, *et al.*** Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. J Virol. 2002;76:5974-84. https://doi.org/10.1128/JVI.76.12.5974-5984.2002

44. **Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Buhler S, Bartenschlager R.** The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. J Biol Chem. 2007; 282:8873-82. https://doi.org/10.1074/jbc.M609919200

45. **Sarmiento L, Rengifo AC, Rivera J, Neira M, Parra E, Méndez J, *et al.*** Glucógeno hepático en dengue severo: análisis histopatológico. Infectio. 2013;17:172-6. https://doi.org/10.1016/S0123-9392(13)70728-8

46. **Thakur P, Lamoke F, Chaffin JM, Bartoli M, Lee JR, Duncan MB.** Dysplastic hepatocytes develop nuclear inclusions in a mouse model of viral hepatitis. PloS One. 2014;9:e99872. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099872

47. **Pryor MJ, Rawlinson SM, Butcher RE, Barton CL, Waterhouse TA, Vasudevan SG, *et al.*** Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 through its importin alpha/beta-recognized nuclear localization sequences is integral to viral infection. Traffic. 2007;8:795-807. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00579.x

48. **Diwaker D, Mishra KP, Ganju L, Singh SB.** Dengue virus non-structural 1 protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H in human monocytic cells. Asian Pac J Trop Med.2016;9:112-8. https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.01.015

49. **Tadano M, Makino Y, Fukunaga T, Okuno Y, Fukai K.** Detection of dengue 4 virus core protein in the nucleus. I. A monoclonal antibody to dengue 4 virus reacts with the antigen in the nucleus and cytoplasm. J Gen Virol. 1989; 70:1409-15. https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-6-1409

50. **Bulich R, Aaskov JG.** Nuclear localization of dengue 2 virus core protein detected with monoclonal antibodies. J Gen Virol. 1992;73:2999-3003. https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-11-2999

CARTA AL EDITOR

Bucaramanga, 14 de febrero de 2018

Señores
Comité Editorial
Revista *Biomédica*
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C.

Estimados señores:

Hemos leído con interés el caso clínico publicado por Ángel Jaimes y Gerzaín Rodríguez sobre leishmaniasis cutánea y embarazo (1). En sus conclusiones se indica que la enfermedad no representa peligro para la madre ni el feto; sin embargo, hoy se plantean dudas sobre sus reales implicaciones durante el embarazo, incluida la trasmisión congénita y perinatal.

Actualmente, se registran cambios relevantes en cuanto a la comprensión de la transmisión (sanguínea, sexual, por trasplante, perinatal y congénita) de muchas enfermedades trasmitidas por vectores y causadas, por ejemplo, por arbovirus, así como de enfermedades tropicales parasitarias en áreas endémicas (2).

La información sobre las infecciones parasitarias, incluida la leishmaniasis, se está revaluando y se plantean preguntas sobre la distribución del parásito y la respuesta inmunitaria materna, aspectos que pueden estar involucrados en la transmisión del parásito de la madre al feto. Asimismo, han surgido dudas sobre los mecanismos implicados en la transmisión cuando se la compara con la de otras infecciones intracelulares protozoarias, como la tripanosomiasis, la malaria y la toxoplasmosis (3).

Hoy se reconoce que la leishmaniasis visceral es la única capaz de generar un compromiso congénito, con un cuadro clínico similar al de la infección adquirida por transmisión vectorial, pero el mecanismo exacto de trasmisión todavía no se comprende cabalmente, en especial por tratarse de una condición que, aparentemente, es poco frecuente. En estudios en animales se ha detectado la invasión placentaria por parte del parásito, lo que altera la estructura placentaria y permite el paso del parásito al feto. Hoy se acepta que la ruta transplacentaria es la única que se ha descrito en la transmisión congénita de la leishmania (3), situación que no fue evaluada en el reporte en mención (1).

Las pocas infecciones reportadas en otros artículos se han descrito a partir de un cuadro con pocos síntomas o ninguno, lo cual se suma a la ausencia de hallazgos patológicos típicos en las placentas o los tejidos circundantes (4). Ello pone de manifiesto que la expresión clínica de la enfermedad no es una condición *sine qua non* del compromiso fetal; además, otras formas de transmisión están por evaluarse, como, por ejemplo, la reacción inmunológica durante el embarazo.

Es posible que exista subdiagnóstico de la infección congénita dado que el personal de salud no reconoce los riesgos y no se reportan los casos probables de riesgo de infección congénita. Dicho subdiagnóstico puede ocurrir en regiones endémicas donde no se puede distinguir la infección vectorial de la congénita durante el primer año de vida. Además, esta puede adquirirse durante el trabajo de parto por vía sanguínea, lo que posiblemente se vería reflejado en el cuadro clínico del lactante. Esto, sin mencionar los reportes de casos de infección congénita en productos de madres asintomáticas, los cuales se detectarían únicamente en la serología, y el hecho de que la expresión clínica puede estar determinada por factores como el tipo de leishmania, el huésped (sensibilidad genética, inmunocompetencia, estado nutricional, comorbilidades) y el ambiente (5,6). Se plantea, entonces, el interrogante de casos en neonatos con un comportamiento similar (asintomáticos perinatales) y la necesidad del diagnóstico perinatal temprano, con el fin de evaluar el modo real de infección y evitar la confusión con otras infecciones congénitas, como la causada por citomegalovirus. Sin embargo, los datos provenientes de estudios en animales apuntan a que el riesgo de transmisión congénita puede estar relacionado con la fase (aguda o crónica) de la enfermedad en la madre durante la gestación (7).

Como lo plantean los autores, la leishmaniasis visceral es la que efectivamente se puede transmitir de forma congénita (1) y, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es una de las siete enfermedades tropicales más importantes y representa un importante problema de salud pública debido a la variabilidad de su presentación clínica y a los potenciales resultados fatales, incluidos los perinatales (8).

La mayoría de los casos son de la forma cutánea; son más comunes en adolescentes y adultos jóvenes residentes en zonas de pobreza extrema y alta

tasa de reproducción. Se sabe que el embarazo incrementa la sensibilidad frente a algunas infecciones, como la malaria, así como el riesgo de que la transmisión de la madre al feto tenga resultados adversos en el feto. Existe el riesgo de transmisión fetal de la leishmaniasis, condición que ya se ha reportado con las formas del parásito caracterizadas por el tropismo visceral, y se cree que varios tipos de lesiones cutáneas pueden guardar relación con efectos fetales adversos (4,9).

La leishmaniasis cutánea en el periodo neonatal es una condición excepcional y se han reportado pocos casos; uno de ellos fue el de un neonato de siete días que presentó lesiones en las mejillas y en los brazos, y tuvo una adecuada respuesta clínica con el antimoniato de meglumina. No hubo reporte de infección materna, lo cual podría relacionarse con el hecho de que, en estos casos, la expresión clínica es variable en las madres. Este caso, además, se manifestó muy tempranamente, lo que permitió sospechar una eventual transmisión congénita (10).

Está comprobado que, en áreas endémicas para infecciones parasitarias, la leishmaniasis visceral, y posiblemente la cutánea, son de transmisión congénita, por ello, esta condición debe estudiarse mejor para ampliar el poco conocimiento que se tiene sobre la fisiopatología de infecciones como la leishmaniasis, la cual se considera una enfermedad olvidada (11). Para finalizar, la evaluación de la placenta, los estudios serológicos y de biología molecular (PCR) en cordón umbilical, y el seguimiento del neonato, podrían contribuir a esclarecer el verdadero riesgo de la infección en la madre y en el feto.

Atentamente,

Jorge Luis Alvarado-Socarrás
Fundación Cardiovascular de Colombia

Edgar Fabián Manrique-Hernández
Universidad Industrial de Santander

Referencias

1. **Jaimes A, Rodríguez G.** Leishmaniasis cutánea y embarazo. Biomédica. 2018;38(Supl.2):8-12. https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.4034
2. **Alvarado-Socarrás JL.** Zika en neonatos: todo no está dicho. Salud UIS. 2016;48:160-2.
3. **Berger BA, Bartlett AH, Saravia NG, Galindo-Sevilla N.** Pathophysiology of leishmania infection during pregnancy. Trends Parasitol. 2017;33:935-46. https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.08.012
4. **Boehme C, Hain U, Novosel A, Eichenlaub S, Fleischmann E, Löscher T.** Congenital visceral leishmaniasis. Emerg Infect Dis. 2006;12:359-60. https://doi.org/10.3201/eid1202.050449d
5. **Machado Mescouto-Borges MR, Maués E, Lamounier Costa D, Da Silva Pranchevicius MC, Sierra Romero GA.** Congenitally transmitted visceral leishmaniasis: Report of two Brazilian human cases. Braz J Infect Dis. 2013;17:263-6. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.017
6. **Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S.** Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 2007;7:581-96. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8
7. **Osorio Y, Rodríguez LD, Bonilla DI, Peniche Ag, Henao H, Saldarriaga O, *et al.*** Congenital transmission of experimental leishmaniasis in a hamster model. Am J Trop Med Hyg. 2012;86:812-20. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0458
8. **Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R.** Leishmaniasis: A review. F1000Res. 2017;26:750. https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1
9. **Morgan DJ, Guimaraes LH, Machado PR, D'Oliveira A Jr, Almeida RP, Lago EL, *et al.*** Cutaneous leishmaniasis during pregnancy: Exhuberant lesions and potential fetal complications. Clin Infect Dis. 2007;45:478-82.
10. **Aoun K, Chetoui A, Rhaiem A, Ghrab J, Dani R, Bouratbine A.** Early cutaneous leishmaniasis in a 7-day-old newborn. Med Trop (Mars). 2005;65:394-5.
11. **Grinnage-Pulley T, Scott B, Petersen CA.** A mother's gift: Congenital transmission of *Trypanosoma* and *Leishmania* species. PLoS Pathog. 2016;12:e1005302. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005302

***

Bogotá, 17 de marzo de 2018

Señores
Revista *Biomédica*
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C.

Apreciados editores:

Damos respuesta a la carta enviada a la revista por los doctores Jorge Luis Alvarado-Socarrás y Edgar Fabián Manrique-Hernández, relacionada con nuestro trabajo "Leishmaniasis cutánea y embarazo", publicado en *Biomédica* (1).

Entre otros conceptos, los autores afirman en su carta que: "En sus conclusiones se indica que la enfermedad no representa peligro para la madre ni el feto; sin embargo, hoy se plantean dudas sobre sus reales implicaciones durante el embarazo, incluida la transmisión congénita y perinatal". La evidencia hasta ahora publicada sugiere ese bajo riesgo fetal en la leishmaniasis cutánea materna.

También, discutimos la notoria falta de investigación sobre el tema de la leishmaniasis y el embarazo, especialmente de la leishmaniasis cutánea (2,3). Resaltamos que en áreas del Brasil se ha observado un mayor número de muertes perinatales y de mortinatos en mujeres embarazadas con leishmaniasis cutánea, sin que se adjunten pruebas del papel jugado por el parásito (3).

Afirman que **"**Hoy se acepta que la ruta transplacentaria es la única que se ha descrito en la transmisión congénita de la leishmania (3), situación que no fue evaluada en el reporte en mención (1)". El reporte en mención es el nuestro. La transmisión congénita de la leishmaniasis cutánea no se ha demostrado en ningún paciente humano. Es un estudio que debe realizarse, teniendo en cuenta las hipótesis de transmisión materno-fetal sin enfermedad o con largos periodos de incubación. Los niños hijos de estas madres deben ser seguidos por años y los padres instruidos para tener en cuenta la posibilidad de que la enfermedad aparezca cuando no hay presencia del vector. Tales estudios deberían tipificar las especies y, en el caso de que aparezca la leishmaniasis cutánea en el hijo, comparar las especies productoras de la enfermedad. El estudio de anticuerpos antileishmania en el recién nacido de una madre con leishmaniasis cutánea, así como de la placenta mediante histopatología y PCR, deberían incluirse en el programa de control de la leishmaniasis.

Afirman los autores que "Está comprobado que en áreas endémicas para infecciones parasitarias, la leishmaniasis visceral y, posiblemente, la cutánea, son de transmisión congénita…". En los humanos esto solo se ha comprobado en el caso de la leishmaniasis visceral, no en la cutánea.

Concluyen los autores afirmando que "la evaluación de la placenta, los estudios serológico y de biología molecular (PCR) en cordón umbilical, y el seguimiento del neonato, podrían contribuir a esclarecer el verdadero riesgo de la infección en la madre y en el feto". Como ya se mencionó, este es un proyecto que debe realizarse.

No pudimos consultar el interesante caso del niño nacido de una madre sana que presentó lesiones de leishmaniasis cutánea curadas con antimoniato de meglumina (Glucantime™) (4). Los autores no informan sobre la especie productora ni sobre la localización geográfica del paciente. Desde luego, es un caso que sugiere la transmisión congénita de la leishmaniasis cutánea.

Agradecemos a los autores por sus comentarios.

Atentamente,

Ángel Jaimes
Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta

Gerzaín Rodríguez
Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana

Referencias

1. **Jaimes A, Rodríguez G.** Leishmaniasis cutánea y embarazo. Biomédica. 2018;38(3). https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.4034
2. **Berger BA, Bartlett AH, Saravia NG, Galindo-Sevilla N.** Pathophysiology of Leishmania infection during pregnancy. Trends Parasitol. 2017;33:935-46. https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.08.012
3. **Morgan DJ, Guimaraes LH, Machado PRL, D´Oliveira Jr A, Almeida RP, Lago EL, *et al.*** Cutaneous leishmaniasis during pregnancy: Exhuberant lesions and potential fetal complications. Clin Infect Dis 2007;45:478-82.
4. **Aoun K, Chetoui A, Rhaiem A, Ghrab J, Dani R, Bouratbine A.** Early cutaneous leishmaniasis in a 7-day-old newborn. Med Trop (Mars). 2005;65:394-5.

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.

La revista *Biomédic*a es de acceso libre e incluye metadatos de citación para todas las referencias de los artículos publicados y las deposita en *CrossRef* (http://www.crossref.org/).

Información general sobre los manuscritos

Biomédica publica trabajos científicos, escritos en español o en inglés, en las siguientes categorías.

Artículo original: trabajo inédito derivado de una investigación biomédica que aporta información nueva sobre aspectos específicos y contribuye de manera relevante al conocimiento científico.

Comunicación breve: es el informe de resultados parciales o finales de una investigación, cuya divulgación rápida sea de gran importancia.

Nota técnica: describe en detalle una técnica de laboratorio novedosa o modificaciones de una técnica ya establecida, enfatizando las ventajas que tiene el procedimiento o la innovación desarrollados.

Ensayo: es un manuscrito filosófico, literario o científico que presenta la opinión sustentada del autor sobre un tema específico o de actualidad.

Comentario: manuscrito sobre un artículo publicado en la revista.

Reseña histórica: es un manuscrito que destaca personajes o sucesos y su contribución al desarrollo de las ciencias biomédicas o de las políticas en salud.

Revisión de tema: presenta el estado actual del conocimiento sobre un tema; puede ser de dos tipos:

1) solicitada directamente por el Comité Editorial a personas expertas en el tema,

2) presentada por profesionales interesados en un tema en particular. En este caso, se debe enviar inicialmente al Comité Editorial la propuesta en la que se indique por qué el tema escogido es pertinente para los lectores de *Biomédica*, así como una breve descripción del contenido, las referencias clave, las publicaciones de los autores sobre el tema que serán incluidas (requisito obligatorio), los datos inéditos de los autores que se incluirán en la revisión (requisito obligatorio), la probable extensión del documento y el número aproximado de ilustraciones.

En ambas casos, los autores deben estructurar la revisión de la siguiente manera:

- incluir un resumen con énfasis en el significado de los hallazgos recientes;
- una introducción al tema, señalando hitos pasados y desarrollos presentes;
- encabezamientos en el texto, con el objeto de hacer más provechosa su lectura;
- la revisión debe incluir un análisis crítico de la bibliografía y los datos propios de los autores;
- el desarrollo del tema queda a discreción del autor, pero se aconseja que incluya tablas, esquemas y figuras, que hagan ágil el texto y ofrezcan una comprensión más rápida de su contenido. En caso de usar figuras tomadas total o parcialmente de otras publicaciones, los autores deben adjuntar el permiso de la casa editorial que ostente los derechos de autor para su reproducción en *Biomédica*.

Imágenes en biomedicina: es un trabajo ilustrado con fotografías que muestran y explican de manera didáctica un concepto, una estructura, una enfermedad o un diagnóstico biomédico. Debe incluir un comentario corto que resalte la importancia del tema ilustrado.

Haga usted el diagnóstico: pretende retar la capacidad diagnóstica de los lectores, utilizando

ilustraciones o fotografías de casos clínicos o de hallazgos microscópicos. Consta de dos partes, la presentación clínica y los hallazgos correspondientes, y el diagnóstico correcto; este último aparece en una página aparte y debe acompañarse de un comentario actualizado sobre la entidad que se pretende ilustrar.

Presentación de casos: son ejemplos de casos clínicos que destacan alguna particularidad o señalan un hallazgo especial de la enfermedad, con una revisión breve de las publicaciones pertinentes.

Cartas al editor: los lectores pueden solicitar aclaraciones o presentar comentarios sobre el material publicado en la revista. La decisión sobre la publicación de las cartas recibidas queda a discreción del Comité Editorial.

Comentarios bibliográficos: son escritos críticos breves sobre libros de salud o de biomedicina.

Preparación del manuscrito

Los autores deben ceñirse a las indicaciones del *International Committee of Medical Journal Editors*, que se encuentran publicadas como *Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals* (*Updated December 2013*) (http://icmje.org/icmje-recommendations.pdf).

El manuscrito debe incluir las siguientes secciones.

Hoja de presentación: esta sección debe incluir

- título (máximo 165 caracteres),
- título corto para los encabezamientos de las páginas (máximo 50 caracteres),
- título en inglés (máximo 165 caracteres),
- un párrafo con los nombres completos de los autores únicamente con el primer apellido,
- la afiliación institucional integrada por grupo, institución, ciudad y país. La afiliación institucional se relaciona con los autores con números en superíndice y en ella se deben omitir cargos y títulos académicos,
- datos de correspondencia: nombre del autor responsable, dirección completa, número telefónico y de fax, y dirección electrónica, y
- párrafo donde los autores declaren cuál fue el aporte al documento de cada uno de ellos.

Resúmenes: el trabajo debe incluir un resumen estructurado en español e inglés, con los subtítulos introducción, objetivo, materiales y métodos, resultados y conclusión. Los resúmenes no deben exceder las 250 palabras. No se permite el uso de referencias ni se recomienda la inclusión de siglas o acrónimos.

Palabras clave: se requieren de 6 a 10 palabras clave en cada idioma; consulte los Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS) del índice de la Literatura Latinoamericana y del Caribe en Ciencias de la Salud (LILACS) en http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm; para verificar las de inglés, consulte los *Medical Subject Headings* (MeSH) del *Index Medicus* en http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm.

Texto: todo el manuscrito, incluso la página del título, los resúmenes, las referencias, las leyendas de figuras y cuadros, debe estar escrito en letra Arial de 12 puntos de tamaño a doble espacio y alineado a la izquierda, sin dejar espacios extras entre párrafos; se debe dejar un solo espacio después del punto y seguido o del punto y aparte.

Los cuadros se deben configurar en letra Arial de 10 puntos de tamaño a espacio sencillo.

Se debe usar letra bastardilla o cursiva para los términos científicos, sin subrayarlos.

Los números decimales en español deben separarse de los números enteros por comas, no por puntos.

Formato electrónico: el manuscrito se debe enviar en Word, preferiblemente en la versión 97-2003. Además de ser adjuntas al documento de Word, las figuras se deben enviar preferentemente como fichero complementario en formato tiff (*Tagged Image File Format*) de 300 dpi (*dots per inch*). Las gráficas elaboradas en *PowerPoint o Word* son de baja resolución, por lo tanto, no se deben incluir este tipo de imágenes en formato electrónico. Las ilustraciones se imprimen en una columna (75 mm) o en dos columnas (153 mm); por consiguiente, se deben enviar las ilustraciones del tamaño en que van a quedar impresas. Si las ilustraciones son en color y se remiten en formato electrónico, se deben enviar en archivos CMYK en formato tiff (*Tagged Image File Format*) de alta resolución. Si la imagen no tiene texto incluido, la resolución óptima para los archivos CMYK es de 300 dpi; si incluye texto, la resolución recomendada es de 600 dpi y, si son de blanco y negro, de 1.200 dpi. La fuente preferida para las gráficas es Helvética. Si sus archivos son de Macintosh, debe convertirlos a uno de los formatos mencionados. Se requiere una lista completa de los archivos enviados, que incluya los programas cuyo formato se utilizó.

Agradecimientos: cuando en esta sección se nombren personas, los autores deben certificar que ellos tienen conocimiento y están de acuerdo con aparecer en los agradecimientos. Esto no es necesario cuando se nombran entidades.

Conflicto de intereses y financiación: los autores deben incluir, antes de las referencias del manuscrito, un párrafo en el que expresen si existen conflictos de intereses o si no los hay. Además, debe presentarse otro párrafo que incluya la fuente de financiación de la investigación adelantada.

Biomédica acoge las recomendaciones del ICMJE y adopta el formato de declaración de potenciales conflictos de intereses, el cual debe ser diligenciado individualmente por cada uno de los autores del manuscrito y enviado junto con la carta de remisión. El formulario electrónico está disponible en http://www.icmje.org/conflicts-of-interest/.

Referencias bibliográficas: es indispensable observar estrictamente las indicaciones de los requisitos uniformes para manuscritos del área biomédica. Se le asigna un número a cada referencia citada del texto, así como a los cuadros y a las figuras, en orden ascendente. Los números de las referencias se anotan entre paréntesis y no como superíndice.

Las comunicaciones personales, los datos sin publicar, los manuscritos en preparación o sometidos para publicación y los resúmenes de trabajos presentados en congresos, se deben citar entre paréntesis en el cuerpo del manuscrito y no en la sección de referencias.

La abreviatura exacta de la revista citada se debe consultar en la lista de publicaciones periódicas del *Index Medicus* (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html); si la revista no aparece, se escribe el título completo de la revista. Solo se deben transcribir los seis primeros autores del artículo, seguidos de *et al.* Se recomienda la inclusión de referencias nacionales y latinoamericanas, para lo cual se puede consultar Lilacs, Publindex, Latindex, Redalyc, Sibra y otras fuentes bibliográficas pertinentes.

En caso de dudas sobre la forma correcta de citar una referencia (artículo científico, libro, tesis, página de internet, etc.), se sugiere consultar la página http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html, en la cual se encuentran ejemplos de todos y cada uno de los posibles casos.

A continuación se dan algunos ejemplos para el estilo de las referencias, siguiendo las normas de Vancouver.

Revista científica: la forma adecuada de citar revistas científicas es la siguiente (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título. Abreviatura de la revista. Año;volumen:página inicial-página final. http://dx.doi.org/

Ejemplo:

Sánchez J, Villada OA, Rojas ML, Montoya L, Díaz A, Vargas C, *et al*. Efecto del zinc aminoquelado y el sulfato de zinc en la incidencia de la infección respiratoria y la diarrea en niños preescolares de centros infantiles. Biomédica. 2014;34:79-91. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1581

Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. J Immunol Methods. 2004;294:15-22. http://dx.doi.org/10. 1016/j.jim.2004.08.008

Libro o documento: la forma adecuada de citar libros o documentos es (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título. Edición (en los casos que corresponda). Ciudad de publicación: editorial; año. página inicial-página final o número total de páginas.

Ejemplo:

Bernard HR. Research methods in anthropology: Qualitative and quantitative approaches. Second edition. Thousand Oaks, CA: Sage Publications; 1994. 585 p.

Capítulo de libro o documento: la forma adecuada de citar capítulos de libros o documentos es la siguiente (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título del capítulo. En: autor del libro, editores. Título del libro. Edición (en los casos que corresponda). Ciudad de publicación: editorial; año. página inicial-página final.

Ejemplo:

Franco JL, Orrego JC, Montoya CJ, Patiño PJ. Síndrome de infección recurrente. En: Correa JA, Gómez JF, Posada R, editores. Fundamentos de Pediatría. Tercera edición. Medellín: Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas; 2007. p. 15-50.

***Documentos en páginas web*:** la forma adecuada de citar documentos publicados en páginas web, es la siguiente (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título. Fecha de consulta: día, mes, año. Disponible en: página exacta en donde abre el documento.

Ejemplo:

Ministerio de la Protección Social. Actualización integral del POS 2013. Fecha de consulta: 26 de febrero del 2014. Disponible en: http://www.pos.gov.co/Documents/LISTADO%20MEDICAMENTOS%20ACUERDO%20008%20CRES.pdf.

Cuadros y figuras: los cuadros se elaboran usando el formato de Word; abstenerse de preparar archivos en columnas o tabulados en el texto mismo del manuscrito.

En las preparaciones de microscopio, se deben mencionar la coloración y el aumento según el objetivo utilizado, sin incluir el valor del ocular.

Cuando se utilicen cuadros o figuras que ya hayan sido publicados, se requiere enviar la autorización de la casa editorial que ostenta los derechos de reproducción.

Remisión del manuscrito

El manuscrito debe ser remitido a través del sistema en línea disponible en el enlace de información para autores en http://www.revistabiomedica.org/.

Sin embargo, se debe enviar la carta impresa de remisión firmada en original por todos los autores, en la que conste que todos conocen y están de acuerdo con su contenido, y que el manuscrito no ha sido publicado anteriormente ni se ha sometido a publicación simultánea en otra revista, a la oficina de la revista ubicada en la siguiente dirección:

Revista Biomédica

Instituto Nacional de Salud

Avenida Calle 26 N° 51-20, bloque B, oficina B-245

Bogotá, D.C., Zona 6, Colombia, S.A.

Los autores radicados en otros países pueden enviar la carta de remisión firmada y escaneada desde sus correos electrónicos personales, al correo de la revista (biomedica@ins.gov.co), informando que se entrega por este medio por encontrarse en el exterior.

Solo cuando se reciba la carta de remisión en la oficina de la revista (autores nacionales), o todos los correos (autores internacionales), se iniciará el proceso de revisión editorial del manuscrito.

Al someter un manuscrito para publicación en *Biomédica*, los autores aceptan con su firma, explícita o implícitamente, que:

1) Conocen las instrucciones para los autores y las han seguido detalladamente.
2) Todos los autores cumplen todos los criterios internacionalmente aceptados para ser considerados como tal.
3) No se ha excluido de la lista de autores el nombre de ningún autor que reúna los requisitos para serlo.
4) Todos los autores conocen la versión final del manuscrito sometido para publicación y están de acuerdo con ella.
5) No se ha incurrido en conducta alguna que pueda considerarse como transgresión de la integridad científica o de los principios éticos que rigen las publicaciones científicas.

BIOMÉDICA

Lista de verificación

Con el fin de comprobar que se hayan cumplido todas las instrucciones correspondientes a las normas de publicación de la revista *Biomédica*, le solicitamos que diligencie en línea la siguiente lista de verificación y la presente junto con su manuscrito.

Categoría

___ Artículo original
___ Revisión de tema
___ Comentario
___ Presentación de caso
___ Carta al editor
___ Comunicación breve
___ Reseña histórica
___ Imágenes en biomedicina
___ Haga usted el diagnóstico
___ Reseña bibliográfica
___ Nota técnica
___ Ensayo

1- Presentación

___ Texto escrito a doble espacio en fuente Arial de 12 puntos de tamaño y alineado a la izquierda

___ Páginas numeradas consecutivamente en la esquina inferior derecha

2- Título

___ Se incluyen los títulos en español e inglés (máximo 165 caracteres).

___ Se incluye el título abreviado en español, o inglés en los casos pertinentes (máximo 50 caracteres).

___ Los autores aparecen sólo con su afiliación institucional, sin mencionar cargos ni títulos académicos.

___ El autor de la correspondencia suministró los datos completos: nombre, apellidos, dirección, teléfono, fax y dirección electrónica.

3- Resumen

___ Se incluye el resumen estructurado en español e inglés, con una extensión máxima de 250 palabras y con los siguientes subtítulos: introducción, objetivos, materiales y métodos, resultados y conclusiones.
El resumen estructurado solo se requiere para artículos originales y comunicaciones breves.

4- Palabras clave

___ Se incluyen 6 a 10 por artículo en cada idioma.

___ Se usan las palabras clave en español e inglés indexadas en los Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS) (http://decs.bvs.br/E/homepagee.html) y *Medical Subject Headings* (MeSH) (http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm).

5- Estructura del artículo original, nota técnica y comunicación breve

Se incluyen los siguientes apartados:

___ Introducción

___ Materiales y métodos

___ Resultados

___ Discusión

___ Agradecimientos

___ Declaración de conflicto de intereses

___ Financiación

___ Referencias

___ Cuadros y figuras con sus respectivas leyendas

6- Figuras

___ Se incluye cada una en página aparte, con su respectiva leyenda.

7- Cuadros

___ Se adjuntan en hoja aparte, elaborados en el modelo de tablas de Word, configurados en Arial 10 a espacio sencillo.

___ Se ordenan secuencialmente.

___ Se incluye la leyenda correspondiente.

8- Referencias

___ Las referencias se numeran según el orden de su aparición en el texto.

___ Se ordenan secuencialmente y en el formato adecuado, tal y como lo indican las normas de *Biomédica* en las instrucciones para los autores.

___ Cuando se citan referencias en los cuadros, éstas deben seguir el orden que se venía usando en el texto.

9- Abreviaturas y siglas

___ Se anotan entre paréntesis después de la primera vez que aparezcan, en forma completa y en el idioma original, los términos que se abrevian. Debe evitarse el uso y la creación de siglas que no sean universalmente reconocidas.

10- Nomenclatura

___ Los nombres taxonómicos de género y especie están escritos en letra cursiva.

___ Los nombres de microorganismos se escriben completos la primera vez que se citan, incluso en el título y en el resumen; después, se usa solamente la inicial del género y el nombre completo de la especie.

11- Consideraciones generales

___ Se envió carta impresa firmada por todos los autores o, en caso de autores radicados en el extranjero, una carta de remisión firmada y escaneada desde sus correos electrónicos personales.

___ Se incluyó el formato de declaración de conflicto de interés diligenciado por cada uno de los autores.

___ Se obtuvo autorización del Comité de Ética para la experimentación en humanos o animales, la cual debe incluirse al final de la sección de Materiales y métodos.

___ Se incluyeron el sitio y el número de registro del ensayo clínico, para la intervención y experimentación en humanos.

___ Los autores certifican al Comité Editorial que las personas mencionadas en los agradecimientos tienen conocimiento de dicha mención y están de acuerdo con aparecer en ellos.

___ Todos los manuscritos incluyen una declaración sobre la fuente de financiación.

___ Se envían los nombres de los cuatro evaluadores nacionales y los cuatro internacionales, con sus respectivos datos (nombre, afiliación institucional y correo electrónico).

Instructions to authors

Scope and policy

Biomédica is the quarterly journal of the *Instituto Nacional de Salud of Colombia* [Colombia's National Institute of Health]. Its main purpose is to publish the results of original research that may contribute to expand knowledge in biomedicine.

Editorial policy

Biomédica accepts and subscribes the guidelines established by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) (www.icmje.org), by the Equator Network (http://www.equator-network.org/) and by the Committee on Publication Ethics (COPE) (http://publicationethics.org/) in order to guarantee the quality of scientific publications, their transparency, integrity and full compliance with the ethical principles applicable to biomedical research.

Biomédica's policy on authorship adheres to the ICMJE guidelines, which state in this regard that:

"Authorship should be based solely on the following:

1) Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work;

2) drafting the work or revising it critically for important intellectual content;

3) final approval of the version to be published, and

4) responsibility for all aspects of the manuscript to ensure that matters concerning accuracy and completeness of any of its sections have been appropriately investigated and solved.

All authors should meet these four conditions. Fund raising, data collection or general supervision of the research group do not justify authorship."

Biomédica will not accept the inclusion or withdrawal of any author from the original list once the manuscript has started the editorial process. In exceptional, applicable cases, it will be mandatory to obtain written consent of the author(s) whose name(s) are to be removed from or added to the manuscript. Besides, written consent should be sent stating that all authors meet authorship criteria, and that there are no other authors who meet these criteria and are not mentioned. The document should also describe in detail the contribution of each participant to the research work and to the article.

Clinical trials registration

Biomédica subscribes the policies of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journals Editors (ICMJE) regarding clinical trials registration. Therefore, it will accept for publication only those manuscripts on clinical research exhibiting the identification number from one of the clinical trial registries validated according to the criteria established by WHO and the ICMJE. The identification number and place of registry should be mentioned after the Abstract.

Copyright notice

No national or foreign publication may reproduce or translate articles or abstracts from *Biomédica* without previous written authorization by the Editorial Board.

Privacy statement

The names and e-mail addresses provided to *Biomédica* will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.

Editorial process

All manuscripts submitted for publication to *Biomédica* will be reviewed by the Editorial Board and sent for peer review to at least two experts. To facilitate this process, authors must suggest and send via the journal on-line platform the names, institutional affiliation and e-mail addresses of four national and four international reviewers whose names should not be included in the manuscript.

Once the authors receive the reviewers' comments, they must address each comment, in addition to incorporating the corresponding modifications in the text. The authors must reply to the reviewer comments within two weeks after receiving them; if *Biomédica* has not received the authors' reply during the following four weeks, the paper will be withdrawn.

Once the paper has been accepted for publication, the Editorial Board will not accept modifications in its content, and it will request a copyright transfer statement signed by all authors. Additionally, authors should certify the quality of the English language in the manuscript or in the abstract on a document signed by an expert and sent to the journal before two weeks.

The original manuscripts of articles accepted to be published will remain in the journal files for a minimum of one year after publication. Once the paper has been accepted for publication, and after editing and style correction, authors will receive the galley proofs, which must be carefully reviewed and returned to the editors within 48 hours after receipt by the authors.

Biomédica is an open access journal and it includes citation metadata for all references in published articles, all of which are deposited in CrossRef (http://www.crossref.org/).

General information on manuscripts

Biomédica will publish scientific papers written in Spanish or English, in the following categories:

Original articles: Unpublished manuscripts resulting from biomedical research which present new information about specific aspects and provides a relevant contribution to scientific knowledge.

Short communication: Report of partial or final results of research whose rapid disclosure is of great importance.

Technical note: Detailed description of a new laboratory technique or of modifications done to an established technique, emphasizing the advantages that the process has, or the importance of the innovation developed.

Essay: A philosophical, literary, or scientific manuscript that presents an author's documented opinion about a specific topic or a topic of current interest.

Commentary: A manuscript about an article published in the journal.

History: A manuscript that places emphasis on historical personalities or facts, and their contributions to the development of biomedical sciences or health policies.

Topic review: the current state of the art on a specific topic; it includes two categories:

1) Requested by the Editorial Board to experts on a topic.

2) Presented by professionals interested in a particular topic. For this option, authors must send a proposal indicating why the topic selected is relevant to the readers of *Biomédica* including a brief description, some key references, publications by the authors on the topic that are to be cited (mandatory), unpublished data by the authors that are to be included (mandatory), the probable size of the manuscript and the approximate number of illustrations.

In both categories, authors should include the following elements:

- An abstract with emphasis on the significance of recent findings;
- a pointed introduction to the topic showing past landmarks and present developments;
- appropriate subtitles to facilitate a better under-standing of the manuscript;
- the development of the topic is left to the discretion of the authors, but they are advised to include tables, graphics and figures to provide a clearer understanding of the text. In case figures are taken partially or totally from other publications, authors must attach the permission from the copyright holder for their reproduction in *Biomédica*.

Images in biomedicine: An illustrated paper with photographs demonstrating and explaining a concept, a structure, a disease or a biomedical diagnosis. It must include a short commentary emphasizing the importance of the illustrated topic.

Make your own diagnosis: The purpose of papers presented in this category is to challenge the diagnostic ability of readers, using illustrations or photographs of clinical data, or microscopic findings. It has two parts, the clinical presentation and the corresponding findings in the first part, and the correct diagnosis in the second part. The latter should appear on a separate page and with an updated comment on the disease it highlights.

Case presentation: Clinical cases with peculiar presentations or special features of diagnostic value and a brief review of the relevant literature.

Letters to the editor: Readers can request explanations or comment on articles published in the journal. The decision to publish these letters lies on the Editorial Board.

Book review: Brief critical writings on books about health and biomedicine.

Preparation of the manuscript

Please follow the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors that are published as "Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals" (updated December 2013) (http://icmje.org/icmje-recommendations.pdf).

The manuscript must include the following sections:

Presentation page: This section must include the following items:

- Manuscript title (maximum 165 characters)
- Running title for page headlines (maximum 50 characters)
- Spanish title (maximum 165 characters)
- A paragraph with the authors' full names (include only first family name)
- The institutional affiliation of each author including the name of their group, institution, city and country. The link of authors' names and institutional affiliation should be done using numbers in superscript. Omit positions held and academic qualifications.
- Name of corresponding author, along with postal address, telephone and fax numbers and e-mail address
- A paragraph stating authors' specific contribution to the article.

Abstracts: The manuscript must include a structured abstract (introduction, objective, materials and methods, results and conclusions) in both Spanish and English, not longer than 250 words. The use of references is not allowed in the abstract, and the inclusion of abbreviations and acronyms is not recommended.

Key words: No more than ten key words in each language are permitted. Authors are advised to verify the English keywords in the Medical Subject Headings (MeSH) of the Index Medicus available from http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm, and the Spanish keywords in *Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS)* of the Latin American and Caribbean Health Sciences index available from http://decs.bvs.br

Text: All manuscripts, including the presentation page, abstracts, references, tables and titles of figures and tables, should be in double space. Leave only a single space after the end of each paragraph. Use Arial font size 12 for the text and for table and figure titles, and do not justify the text (left justified). Use italic letters for species names or scientific terms; do not underline for italicization.

Electronic format: The manuscript must be received as an MS Word™ file, preferably in the 97-2003 version. Figures should come attached to the Word document and they should be sent preferably in a 300 dpi tiff format. Graphics made with Power Point™ or MS Word programs are not acceptable because of low resolution. Illustrations are printed in a single column (75 mm) or in two columns (153 mm), therefore, illustrations must be sent in one of these two print sizes. In the case of color illustrations, please use CMYK files in a high resolution tiff format. The best resolution for CMYK files is 300 dpi if the image does not include text. If the image includes text, the recommended resolution is 600 dpi; if it is black and white, the recommended resolution is 1200 dpi. The recommended font for graphics is Helvetic. If your files are Macintosh, please convert them to one of the above formats. A complete list of the files must be sent including the names of the programs in which they were formatted.

Acknowledgements: Authors should certify that persons mentioned in the Acknowledgements have been informed and they have agreed to it. This is not required in the case of institutions.

Conflicts of interest and financial support statements: Authors must place these statements before the References section in separate paragraphs.

Biomédica subscribes the ICMJE recommendations in this respect and adopts their format for the statement of potential conflicts of interest, which should be filled out individually by each author and sent along with the letter of submission. The electronic format is available from http://www.icmje.org/conflicts-of-interest/.

References: Strict adherence to the guidelines of the uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals is required. A number is assigned to each reference as it appears in the manuscript, the tables and figures in ascending order. The reference numbers are placed within parenthesis (not as indices or superscripts).

Personal communications, unpublished data, manuscripts in preparation or submitted for publication, and abstracts presented at congresses or other scientific meetings must not be numbered but rather referenced in the text within parenthesis.

Consult the periodical publications list of Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd7serials7lij.html) for exact abbreviations of journal names. If the journal is not listed, write its full title. Include only the first six authors of the article, followed by *et al.* The inclusion of national and Latin-American references

is recommended. For this purpose, please consult Lilacs, Latindex, Sibra, or Colciencia's indices, and other pertinent bibliographic sources.

The following are some examples of references from different types of publications according to the Vancouver style.

Scientific journal: The adequate way of citing scientific journals is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title. Journal's abbreviated name. Year;volume:initial page-last page. http://dx.doi.org/

Examples:

Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. J Immunol Methods. 2004;294:15-22. http://dx.doi.org/10. 1016/j.jim.2004.08.008

Sánchez J, Villada OA, Rojas ML, Montoya L, Díaz A, Vargas C, *et al*. Efecto del zinc aminoquelado y el sulfato de zinc en la incidencia de la infección respiratoria y la diarrea en niños preescolares de centros infantiles. Biomédica. 2014;34:79-91. http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1581

Book or document: The adequate way of citing books or documents is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title. Edition (when applicable). Place of publication: Publisher; year. Initial page-last page or total number of pages.

Example:

Bernard HR. Research methods in anthropology: Qualitative and quantitative approaches. Second edition. Thousand Oaks, CA: Sage Publications; 1994. 585 p.

Book chapter or document: The adequate way of citing book chapters or documents is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title of chapter. In: name of book author(s), editor(s). Title of book. Edition (when applicable). Place of publication: Publisher; year. Initial page - last page or total number of pages.

Example:

Restrepo A, Tobón AM, Agudelo CA. Paracoccidioidomycosis. In: Hospenthal DR, Rinaldi MG, editors. Diagnosis and treatment of human mycoses. 1st edition. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 127-331.

Documents in web sites: The adequate way of citing documents published in web sites is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title. Citation date: day, month, year. Available from: exact link to open the document.

Example:

Nucci M, Colombo AL. Clinical manifestations and diagnosis of acute/subacute paracoccidioidomycosis. UpToDate. 2012. Citation date: October 15,2012. Available from: http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-acute-subacute-paracoccidioidomycosis.

Tables and figures: Tables must be formatted using the Word processing tool for this purpose. Do not include columns or tabulations within the text of the manuscript.

Regarding microscope slides, include the staining and lens increase in the objective, but do not include the value of the ocular.

In the case of tables or figures previously published, an authorization by the copyright holder should be attached for publication in *Biomédica*.

Manuscript submission

The manuscript should be submitted to *Biomédica*'s on-line platform using the link "*Información para autores*", available from http://www.revistabiomedica.org/. However, a printed letter signed by all authors stating that they know the contents of the manuscript, that they agree to its submission for publication in *Biomédica,* and explicitly stating that the manuscript has not been published or submitted for publication to any other journal should be sent to the following address:

Revista Biomédica
Instituto Nacional de Salud
Avenida Calle 26 No. 51-20, bloque B, oficina B-245
Bogotá D.C., Zona 6, Colombia

Authors living in foreign countries may send the letter signed and scanned via e-mail to *Biomédica*'s

e-mail: biomedica@ins.gov.co, explaining that they do so because they are settled abroad.

Once the printed letter of submission (in the case of local authors), or the e-mails (in the case of authors abroad) have been received at *Biomédica*'s office, the editorial review process will start.

The submission of a manuscript to *Biomédica* for publication implies the acceptance by the authors of the following:

- Full knowledge and strict adherence to the instructions to authors;
- compliance with the internationally accepted authorship criteria;
- inclusion of all authors that meet authorship criteria;
- total agreement with the final version of the manuscript submitted for publication, and
- no engagement in any conduct that may be considered a transgression of the scientific integrity or the ethical principles of scientific publications.

Checklist for submitted manuscripts

For the purpose of verifying that authors have complied with *Biomédica*'s publication guidelines, the corresponding author should include the following checklist along with the manuscript:

Category

___ Original article
___ Short communication
___ Technical note
___ Topic review
___ Historical paper
___ Essay
___ Commentary
___ Images in biomedicine
___ Case presentation
___ Make your own diagnosis
___ Letter to the editor
___ Book review

1. Presentation

___ Text written in double space, in Arial font size 12 point, on one side of letter-size pages

___ Pages numbered consecutively

2. Title

___ Title in Spanish and English (maximum 165 characters)

___ Running title in the same language used in the text of the manuscript (Spanish or English, maximum 50 characters)

___ Authors' names with institutional affiliations (do not include current positions or academic titles)

___ Corresponding author's information: name, postal address, phone number, fax number, e-mail address

3. Abstracts

___ Structured abstract both in Spanish and English (maximum 250 words) using the following subtitles: Introduction, Objective(s), Materials and methods, Results, Conclusion(s). The inclusion of a structured abstract applies only for original articles and short communications.

4. Keywords

___ 6 to 10 per manuscript in each language

___ Keywords in English previously verified in the Medical Subject Headings (MeSH) of Index Medicus available from http://www.nlm.nih.gov/mesh7meshhome.htm, and Spanish keywords verified in *Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS)* of the Latin American and Caribbean Health Sciences index available from http://decs.bvs.br

5. Structure of an original article, technical note or short communication

Include the following sections:

___ Introduction

___ Materials and methods

___ Results

___ Discussion

___ Acknowledgements

___ Conflicts of interest statement

___ Financial support statement

___ References

___ Tables and figures with their corresponding titles.

6. Figures

___ Figures should go on a separate page with its corresponding title

7. Tables

___ Tables should go on a separate page, in Word format using font Arial size 10 and single space

___ Tables should be numbered consecutively in their order of appearance in the text

___ Include titles for all tables and figures.

8. References

___ References should be numbered consecutively according to the order of citation in the text.

___ *Biomedica´*s guidelines for citing references must be followed strictly.

___ If references are cited in tables or figures, please continue with the consecutive order used in the text.

10. Use of abbreviations and acronyms

___ Write the complete term in its original language with the corresponding abbreviation in parenthesis. Avoid using abbreviations and acronyms that are not universally accepted.

11. Nomenclature

___ Names of genus and species are written in italics

___ Microorganisms scientific names should be written in full the first time they appear in the text, as well as in the title and in the abstracts; after, just use the first letter of the genus followed by a dot and the complete name of the species.

12. General considerations

___ Printed letter of submission signed by all authors. In the case of authors living abroad, the letter should be signed, scanned and sent from their personal e-mails.

___ Conflicts of interest statement in the corresponding form filled out by each author.

___ Manuscripts presenting results from research conducted on human subjects or animals include an explicit statement that ethical clearance was requested and obtained from an institutional ethics committee. This statement goes at the end of the Materials and methods section.

___ Site and registration number for clinical trials in human subjects.

___ Authors certify that the persons whose names are mentioned in the Acknowledgements section are fully aware of this and agree to their inclusion.

___ The financial support statement was included.

___ The names, institutional affiliation and e-mails of the four national and four international reviewers suggested by the authors were included in the letter of submission.