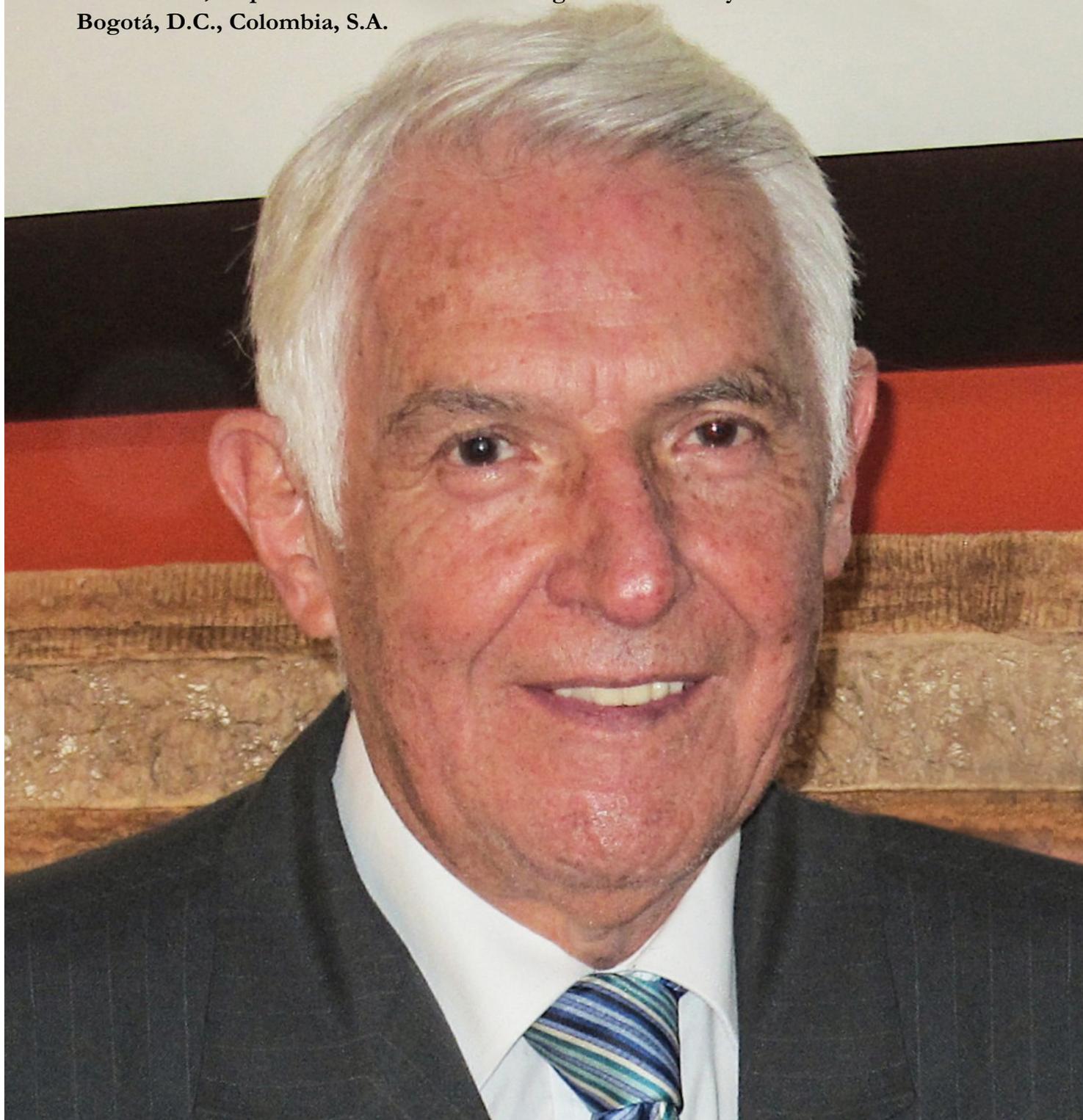


I-ISSN 2590-7379 (Electrónico)

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 39, Suplemento No. 1 - Microbiología médica - Mayo de 2019
Bogotá, D.C., Colombia, S.A.



Portada: Miguel Antonio Guzmán Urrego, 1933-2019
Fundador de la revista *Biomédica* y miembro de su Comité Editorial
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 39, suplemento 1 - Bogotá, D.C., Colombia - Mayo de 2019

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

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 Angeles
Los Angeles, CA, Estados Unidos

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

BLANCA RESTREPO
University of Texas
Brownsville, TX, Estados Unidos

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

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

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

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

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

GIOCONDA SAN BLAS
Instituto Venezolano de
Investigaciones Científicas
Caracas, Venezuela

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

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

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

ROBERT TESH
University of Texas
Galveston, TX, ESTADOS UNIDOS

BRUNO TRAVI
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

GUSTAVO VALBUENA
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

JUAN MIGUEL VILLALOBOS
Universidade Federal de Rondônia
Porto Velho, Brasil

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

CARLOS ARTURO HERNÁNDEZ
Edición y corrección de estilo

LINDA GRACE MOLANO
Asistencia editorial

MARTHA RENZA
Corrección de estilo

ELIZABETH GUZMÁN
Mercadeo digital

LUZ ÁNGELA SALGADO
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 Seriadadas 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

Cambios significativos en el manejo y control del HIV/sida <i>Jorge Alberto Cortés</i>	5
---	---

Presentación de caso

Melioidosis en Colombia, descripción de un caso clínico y consideraciones epidemiológicas <i>José Y. Rodríguez, Carlos A. Álvarez-Moreno, Jorge A. Cortés, Gerson J. Rodríguez, Kelin Esquea, Heidy Pinzón, María J. Mendoza, Yiceth Acosta</i>	10
--	----

Artículo original

Caracterización epidemiológica de la infección por <i>Leptospira</i> spp. en caballos de trabajo y en personas ocupacionalmente expuestas en seis unidades de la Policía Nacional de Colombia <i>Juan Camilo Calderón, Miryam Astudillo, Marlyn H. Romero</i>	19
--	----

Costos médicos directos de las infecciones urinarias por bacilos Gram negativos resistentes a betalactámicos en un hospital de alta complejidad de Medellín, Colombia <i>Carlos Andrés Vargas-Alzate, Luis Felipe Higueta-Gutiérrez, Judy Natalia Jiménez-Quiceno</i>	35
--	----

Un tipo de secuencia común de <i>Salmonella</i> Enteritidis de origen aviar y de humano con gastroenteritis en Ibagué, Colombia <i>Luz Clemencia Fandiño, Noel Verjan-García</i>	50
---	----

Infección por <i>Clostridium difficile</i> : descripción de las cepas NAP1/027 y de otros serotipos en un centro de alta complejidad de Cali, Colombia, 2012-2015 <i>José Millán Oñate-Gutiérrez, Janier Segura, Adriana Correa, Erika Cantor, María Virginia Villegas</i>	63
---	----

Genotipificación de aislamientos del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mediante MIRU-VNTR, Cali, Colombia, 2013-2015 <i>David Felipe García, Myriam Astudillo</i>	71
---	----

Caracterización de los pacientes con bacteriemia por <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina en un hospital militar de alta complejidad <i>Natalie Náder, Ramón Iván Medina, Luz Ángela Pescador, Barbarita María Mantilla, Juan Sebastián Bravo, Carlos Hernando Gómez</i>	86
--	----

Multiresistencia a medicamentos y factores de riesgo asociados con infecciones urinarias por <i>Escherichia coli</i> adquiridas en la comunidad, Venezuela <i>Militza Guzmán, Elsa Salazar, Vicmaris Cordero, Ana Castro, Andreína Villanueva, Hectorina Rodulfo, Marcos De Donato</i>	96
---	----

Caracterización clínica de la leptospirosis grave en un hospital de alta complejidad de Cali, Colombia, 2010-2016 <i>Jorge Cedano, Sarita Rodríguez, Winy Kujundzic, Juan Sebastián Arana, Robinson Pacheco, Fernando Rosso</i>	108
--	-----

La importancia de investigar <i>Mycobacterium bovis</i> en muestras clínicas de procedencia humana <i>Julio Cesar Martínez, Claudia Llerena, Yanely Angélica Valbuena</i>	117
--	-----

<i>Helicobacter pylori</i> : resistencia múltiple en pacientes de Bogotá, Colombia <i>Azucena Arévalo, William Otero, Alba Alicia Trespalacios</i>	125
---	-----

Detección de enterobacterias multiresistentes aisladas en aguas de los ríos que desembocan en la bahía de Guanabara y en muestras de hospitales de Río de Janeiro, Brasil <i>Verônica Dias Gonçalves, Frederico Meirelles-Pereira, Márcio Cataldo, Bianca de Oliveira Fonseca, Barbara Araujo Nogueira, ulianna Giordano Botelho Olivella, Francisco de Assis Esteves, Ana Luiza Mattos-Guaraldi, Arnaldo Feitosa Braga de Andrade, Alexandre Ribeiro Bello, José Augusto Adler Pereira</i>	135
--	-----

Incidencia y subregistro de casos de leptospirosis diagnosticados con tres métodos diferentes en Urabá, Colombia <i>Janeth Pérez-García, Piedad Agudelo-Flórez, Gabriel Jaime Parra-Henao, Jesús Ernesto Ochoa, Margarita Arboleda</i>	150
---	-----

Comunicación breve

Serorreacción y prevalencia de sífilis en donantes de un banco de sangre de Barranquilla, Colombia <i>Juan Carlos Martínez-Garcés, Michael Macías-Vidal, Ronald Maestre-Serrano, Ricardo Ávila-De la Hoz, Eduardo Navarro-Jiménez, Johan Bula-Viecco, Lisbeth Ricaurte-Barrera</i>	163
---	-----

Reseña histórica

Francisco Campos-Rivadeneira y Roberto Levi-Castillo: sus vidas y contribuciones al estudio de los mosquitos (Diptera: Culicidae) en Ecuador <i>Giovani Marcelo Ramón, Rodolfo Pérez, Pablo Jarrín</i>	172
---	-----

Revisión de tema

Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016 <i>Ana Mercedes Rada, Christian Hernández-Gómez, Eliana Restrepo, María Virginia Villegas</i>	199
--	-----

In memoriam

Miguel Antonio Guzmán Urrego <i>Carlos Arturo Hernández</i>	221
--	-----

Contents

Editorial

Significative changes in the management and control of HIV/AIDS <i>Jorge Alberto Cortés</i>	5
--	---

Case presentation

Melioidosis in Colombia, description of a clinical case and epidemiological considerations <i>José Y. Rodríguez, Carlos A. Álvarez-Moreno, Jorge A. Cortés, Gerson J. Rodríguez, Kelin Esquea, Heidy Pinzón, María J. Mendoza, Yiceth Acosta</i>	10
---	----

Original article

Epidemiological characterization of <i>Leptospira</i> spp. infection in working horses and in an occupationally exposed population in six Colombian police stations <i>Juan Camilo Calderón, Miryam Astudillo, Marlyn H. Romero</i>	19
Direct medical costs of urinary tract infections by Gram-negative bacilli resistant to beta-lactams in a tertiary care hospital in Medellín, Colombia <i>Carlos Andrés Vargas-Alzate, Luis Felipe Higueta-Gutiérrez, Judy Natalia Jiménez-Quiceno</i>	
A common <i>Salmonella</i> Enteritidis sequence type from poultry and human gastroenteritis in Ibagué, Colombia <i>Luz Clemencia Fandiño, Noel Verjan-García</i>	50
<i>Clostridium difficile</i> infection: Description of NAP1/027 and non NAP1/027 strains in a high complexity center in Cali, Colombia, 2012-2015 <i>José Millán Oñate-Gutiérrez, Janier Segura, Adriana Correa, Erika Cantor, María Virginia Villegas</i>	63
MIRU-VNTR genotyping of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in a population of patients in Cali, Colombia, 2013-2015 <i>David Felipe García, Myriam Astudillo</i>	71
Characterization of patients with bacteremia by methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> in a high-complexity military hospital <i>Natalie Náder, Ramón Iván Medina, Luz Ángela Pescador, Barbarita María Mantilla, Juan Sebastián Bravo, Carlos Hernando Gómez</i>	86
Multidrug resistance and risk factors associated with community-acquired urinary tract infections caused by <i>Escherichia coli</i> in Venezuela <i>Militza Guzmán, Elsa Salazar, Vicmaris Cordero, Ana Castro, Andreína Villanueva, Hectorina Rodulfo, Marcos De Donato</i>	96
Clinical characterization of patients with severe leptospirosis in a tertiary hospital in Cali, Colombia, 2010-2016 <i>Jorge Cedano, Sarita Rodríguez, Winy Kujundzic, Juan Sebastián Arana, Robinson Pacheco, Fernando Rosso</i>	108
Importance of investigating <i>Mycobacterium bovis</i> in clinical samples of human origin <i>Julio Cesar Martínez, Claudia Llerena, Yanely Angélica Valbuena</i>	117
<i>Helicobacter pylori</i> : Multiple resistance in patients from Bogotá, Colombia <i>Azucena Arévalo, William Otero, Alba Alicia Trespalacios</i>	125
Detection of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from river waters flowing to the Guanabara Bay and from clinical samples of hospitals in Rio de Janeiro, Brazil <i>Verônica Dias Gonçalves, Frederico Meirelles-Pereira, Márcio Cataldo, Bianca de Oliveira Fonseca, Barbara Araujo Nogueira, ulianna Giordano Botelho Olivella, Francisco de Assis Esteves, Ana Luiza Mattos-Guaraldi, Arnaldo Feitosa Braga de Andrade, Alexandre Ribeiro Bello, José Augusto Adler Pereira</i>	135
Incidence and underreporting of leptospirosis comparing three diagnostic methods in the endemic region of Urabá, Colombia <i>Janeth Pérez-García, Piedad Agudelo-Flórez, Gabriel Jaime Parra-Henao, Jesús Ernesto Ochoa, Margarita Arboleda</i>	150
Brief communication	
Seroreactivity and prevalence of syphilis in donors at a blood bank in Barranquilla, Colombia <i>Juan Carlos Martínez-Garcés, Michael Macías-Vidal, Ronald Maestre-Serrano, Ricardo Ávila-De la Hoz, Eduardo Navarro-Jiménez, Johan Bula-Viecco, Lisbeth Ricaurte-Barrera</i>	163
Historical review	
Francisco Campos-Rivadeneira and Roberto Levi-Castillo: Their lives and contributions to the study of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Ecuador <i>Giovani Marcelo Ramón, Rodolfo Pérez, Pablo Jarrín</i>	172
Topic review	
Distribution and molecular characterization of beta-lactamases in Gram-negative bacteria in Colombia, 2001-2016 <i>Ana Mercedes Rada, Christian Hernández-Gómez, Eliana Restrepo, María Virginia Villegas</i>	199
In memoriam	
Miguel Antonio Guzmán Urrego <i>Carlos Arturo Hernández</i>	221

Editorial

Cambios significativos en el manejo y control del HIV/sida

La epidemia de HIV/sida se extendió por África, Europa y América durante las décadas de los años 60 al 80 del siglo pasado e, inicialmente, pasó desapercibida por la comunidad médica y científica. Tan solo con el desarrollo en los años 80 de la tecnología para identificar ciertos grupos de linfocitos T, fue posible iniciar la descripción de los grupos de pacientes en quienes se detectó el síndrome y, eventualmente, se identificó el virus responsable.

La pandemia del HIV es el resultado de la evolución genética de un virus de simios que se extendió a la especie humana (1), y de las condiciones sociales, geográficas y culturales que llevaron a su propagación en el África poscolonial y, de allí, al resto del mundo. Por fuera de África, el virus tuvo un impacto considerable en ciertas comunidades de América y Europa (2), especialmente, en los hombres homosexuales, los usuarios de drogas intravenosas y algunos grupos expuestos a productos sanguíneos por transfusiones.

El impacto social y económico de la epidemia condujo rápidamente a desarrollar una tecnología que garantizara la seguridad de las transfusiones y detectara los pacientes, y que permitió iniciar el estudio de medicamentos para su control de forma relativamente temprana. Además, la pandemia obligó a reflexionar sobre la sexualidad en una sociedad que venía del cambio que significó la liberación femenina y la introducción de los anticonceptivos en los años 60.

La epidemia del HIV ha tenido consecuencias catastróficas, especialmente en varios países de África, por ejemplo, en la República de Sudáfrica, donde la incidencia de la infección tuvo un crecimiento muy importante en las décadas de los 80 y los 90, alcanzando tasas de prevalencia cercanas al 25 o 30 % (3). Concomitantemente, se observó una disminución de la expectativa de vida en muchos países africanos, donde se registraron niveles inferiores a los anteriores al proceso de descolonización, de lo cual se han recuperado gracias al uso del tratamiento antirretroviral (4). El impacto económico y social en la población y en los sistemas de salud de estos países, ha sido muy significativo y buena parte de los esfuerzos internacionales para ayudar a controlar la epidemia se han centrado en esta región.

Pero este desastre epidemiológico también ha servido para que los países con epidemias más contenidas (por ejemplo, los suramericanos), hayan iniciado estrategias para reducir el crecimiento de la epidemia y dar mayor acceso al tratamiento antirretroviral, fundamentalmente con el apoyo de Onusida y de otras organizaciones sin ánimo de lucro, como la *Bill and Melinda Gates Foundation*. En nuestro país, la epidemia sigue concentrada en las grandes ciudades (5), aunque es posible que existan otras formas de circulación del virus en la población heterosexual cuyo foco principal sean las regiones rurales, es decir, procesos epidémicos a nivel local escasamente documentados.

Citación:

Cortés JA. Cambios significativos en el manejo y control del HIV/sida. *Biomédica*. 2019;39(Supl.1):5-9

Uno de los cambios más importantes relacionados con la enfermedad fue el desarrollo de medicamentos antirretrovirales. Relativamente temprano en el desarrollo de la epidemia, se identificaron ciertas sustancias químicas con efecto en la replicación del virus y capaces de bloquear la transcriptasa inversa utilizada de forma específica por este.

A mediados de la década de los años 90, la introducción de un segundo grupo de medicamentos con efecto sobre la proteasa viral permitió establecer el fundamento del tratamiento actual, el cual se basa en la utilización de varios medicamentos capaces de controlar la replicación viral. Una vez logrado esto, la reconstitución inmunológica previene la progresión a sida o la aparición de nuevas enfermedades oportunistas. El efecto a largo plazo para los pacientes ha sido que la infección por HIV pasó de ser una enfermedad letal a ser crónica, como la hipertensión arterial o la diabetes, en la cual un tratamiento crónico y continuo permite controlar las manifestaciones clínicas primarias. Sin embargo, la suspensión del tratamiento puede hacer que se reanude la progresión de la enfermedad, con la consiguiente inmunosupresión y el desarrollo de sida.

Por otro lado, el establecimiento de un tratamiento crónico determina la aparición de los efectos indeseados de los medicamentos, o de fenómenos que pueden estar relacionados con la infección retroviral a largo plazo y que solamente pudieron observarse una vez se controló la letalidad de la enfermedad. En este grupo de fenómenos se encuentra el envejecimiento prematuro (6), con cambios metabólicos importantes en diversos órganos endocrinos (7), el aumento del riesgo cardiovascular (8) y la mayor frecuencia de enfermedades tumorales; estas incluyen los cánceres asociados con la inmunosupresión, semejantes a los relacionados con el virus del papiloma humano (HPV), pero también, aquellos que no están relacionados con infecciones, como el cáncer de pulmón o el de hígado (9).

En esta relación entre los beneficios del tratamiento, los efectos secundarios de los medicamentos y las secuelas de la inmunosupresión crónica, es claro que el paciente se ve favorecido por el tratamiento crónico. En los estudios en países desarrollados, se ha sugerido que un grupo importante de estos pacientes puede alcanzar expectativas de vida similares a las de los pacientes no infectados, aunque con diferencias que pueden ser importantes cuando esta expectativa de vida se ajusta por la calidad de vida, especialmente en mujeres (10).

Por otro lado, la evolución del tratamiento farmacológico ha llevado al desarrollo de medicamentos más efectivos, con menor frecuencia de eventos adversos o de menor gravedad, menor número de tomas al día y menor número de pastillas, especialmente, cuando se tiene en cuenta que la población con HIV envejece y requiere estrategias adicionales para el tratamiento de otras comorbilidades propias de la edad (11).

Hoy en día, la política del uso de medicamentos antirretrovirales busca la cobertura de todos los pacientes, independientemente de su estado inmunológico en el momento de la detección, con beneficios a nivel individual, de salud pública y como estrategia de prevención de nuevas infecciones, con especial interés en la detección de los pacientes durante la infección inicial (12). Otro beneficio ha sido la prevención de la infección en los recién nacidos cuyas madres están infectadas con el virus, la cual ha disminuido el riesgo a menos del 1 % de los casos (13). Un beneficio adicional del uso de los medicamentos antirretrovirales es la prevención –conocida como ‘profilaxis posterior a la exposición’–, cuyo uso se ha extendido bastante en ciertas poblaciones en riesgo (14).

El tratamiento antirretroviral también ha aportado a muchísimas áreas de la medicina. Una de las más importantes ha sido el desarrollo de estrategias para lograr el cumplimiento de los tratamientos. Durante mucho tiempo, en diversas áreas de la Medicina Interna, la Pediatría y la Cirugía, se había ignorado este tema. Sin embargo, es claro que un paciente que no observa las indicaciones de su médico, no tendrá el éxito terapéutico esperado. Este hecho se reconoce por la diferencia esperada entre la eficacia clínica de los ensayos clínicos aleatorizados y la efectividad de los tratamientos en la vida real. Muy tempranamente, fue evidente en el tratamiento de la infección por el HIV que, sin el control virológico, no era posible detener la progresión de la inmunodeficiencia y se reconoció la necesidad de garantizar el cumplimiento del esquema establecido, detectando y controlando las potenciales barreras que impiden a los pacientes tomar adecuadamente sus medicamentos (15). En más del 95 % de los casos, se ha observado que el cumplimiento del tratamiento se asocia con un mejor control virológico y una menor probabilidad de progresión de la enfermedad (16). Dichas estrategias se han aplicado en otras áreas de la Medicina.

El estudio del HIV ha permitido entender mejor el sistema inmunológico. Sin la identificación de los marcadores de linfocitos hace cerca de 40 años, no hubiera sido posible identificar el virus o detectar los pacientes portadores. La identificación del virus y de los factores que llevaban a la inmunodeficiencia, amplió de forma notable nuestro conocimiento de la Inmunología, de la relación con diversos tipos de virus que pueden infectar a los individuos –por ejemplo, el citomegalovirus, el virus de Epstein-Barr y otros– y del papel de innumerables moléculas en la reacción inmunológica normal y la anormal.

Esta rama de la investigación llevó a la identificación de un grupo de moléculas conocidas como ‘correceptores’ a mediados de la década del 90. Entre ellas, la más destacada fue el receptor de quimiocinas, CCR5, por su papel en la entrada del virus en los linfocitos T CD4. Se pudo establecer que ciertos individuos con mutaciones en este correceptor requerían concentraciones virales considerablemente más altas para infectarse y debe anotarse que buena parte de estos estudios se hicieron inicialmente con linfocitos *in vitro*.

Pudo establecerse, así, un grupo de mutaciones que conferían inmunidad a los individuos portadores –usualmente homocigotos–, de las cuales la más importante era la conocida como $\Delta 32$ (delta 32), por representar una delección de 32 pares de bases en la secuencia genética de la proteína. Esta mutación no es muy frecuente en la población norteamericana y europea y es prácticamente inexistente en Sudamérica. La identificación de esta secuencia ha permitido el desarrollo de medicamentos que buscan bloquear la entrada del virus y de terapias genéticas. La prueba de fuego fue un trasplante de médula ósea en un paciente con infección por HIV, cuyo donante tenía la mutación $\Delta 32$ (17). El resultado fue el control virológico, incluso sin tratamiento antirretroviral, es decir, la cura de la enfermedad. Un segundo caso con resultados positivos publicado recientemente, implica la prueba de concepto (18).

Vale la pena mencionar que el trasplante de médula ósea es un proceso complejo y riesgoso, que se utilizó en estos casos porque los pacientes tenían neoplasias hematológicas (una leucemia y un linfoma) que justificaban su uso. Por lo tanto, aunque este no es un procedimiento estándar para el tratamiento del sida, sí implica una posibilidad de control inmunológico basado en el manejo genético de los correceptores, lo cual es importante si se tiene en cuenta que, infortunadamente, las vacunas han producido resultados negativos.

En conclusión, la epidemia de la infección por HIV se ha dado en un contexto social y geográfico específico, con una reacción científica global que permitió el desarrollo de medicamentos, su distribución y uso a nivel mundial, así como una respuesta desde la perspectiva de la salud pública que ha llevado a mejores prospectos para el control de la epidemia, la reducción del número de casos nuevos en algunas partes del mundo y la prevención de la transmisión congénita.

La infección por HIV es una enfermedad crónica hoy en día, con perspectivas de control y tratamiento, pero que aún requiere grandes esfuerzos para determinar las complicaciones relacionadas con la inmunosupresión y el uso crónico de los medicamentos, así como para romper las barreras de acceso al diagnóstico y el tratamiento, así como las de la discriminación. Hemos avanzado mucho, pero aún nos falta camino por recorrer.

Jorge Alberto Cortés

Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Referencias

1. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011;1:a006841. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>
2. Gilbert MT, Rambaut A, Wlasiuk G, Spira TJ, Pitchenik AE, Worobey M. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:18566-70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705329104>
3. Simelela N, Venter WD, Pillay Y, Barron P. A political and social history of HIV in South Africa. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2015;12:256-61. <https://doi.org/10.1007/s11904-015-0259-7>
4. Bor J, Rosen S, Chimbindi N, Haber N, Herbst K, Mutevedzi T, *et al.* Mass HIV treatment and sex disparities in life expectancy: Demographic surveillance in rural South Africa. *PLoS Med.* 2015;12:e1001905. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001905>
5. Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo. Situación del VIH Sida en Colombia 2017. Fecha de consulta: 13 de marzo de 2019. Disponible en: https://cuentadealtocosto.org/site/images/Publicaciones/2018/Situacion_VIH_2017_.pdf
6. Fulop T, Herbein G, Cossarizza A, Witkowski JM, Frost E, Dupuis G, *et al.* Cellular senescence, immunosenescence and HIV. *Interdiscip Top Gerontol Geriatr.* 2017;42:28-46. <https://doi.org/10.1159/000448542>
7. da Cunha J, Maselli LM, Stern AC, Spada C, Bydlowski SP. Impact of antiretroviral therapy on lipid metabolism of human immunodeficiency virus-infected patients: Old and new drugs. *World J Virol.* 2015;4:56-77. <https://doi.org/10.5501/wjv.v4.i2.56>
8. Haser GC, Sumpio B. Systemic and cell-specific mechanisms of vasculopathy induced by human immunodeficiency virus and highly active antiretroviral therapy. *J Vasc Surg.* 2017;65: 849-59. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2016.01.036>
9. Thrift AP, Chiao EY. Are non-HIV malignancies increased in the HIV-infected population? *Curr Infect Dis Rep.* 2018;20:22. <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0626-9>
10. Hogg RS, Eyawo O, Collins AB, Zhang W, Jabbari S, Hull MW, *et al.* Health-adjusted life expectancy in HIV-positive and HIV-negative men and women in British Columbia, Canada: A population-based observational cohort study. *Lancet HIV.* 2017;4: e270-6. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(17\)30029-2](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(17)30029-2)
11. Smith JM, Flexner C. The challenge of polypharmacy in an aging population and implications for future antiretroviral therapy development. *AIDS.* 2017;31(Suppl.2): S173-84. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001401>
12. Prins HAB, Verbon A, Boucher CAB, Rokx C. Ending the epidemic: Critical role of primary HIV infection. *Neth J Med.* 2017;75:321-7.
13. Lynch NG, Johnson AK. Congenital HIV: Prevention of maternal to child transmission. *Adv Neonatal Care.* 2018;18:330-40. <https://doi.org/10.1097/ANC.0000000000000559>

14. Koechlin FM, Fonner VA, Dalglish SL, O'Reilly KR, Baggaley R, Grant RM, *et al.* Values and preferences on the use of oral pre-exposure prophylaxis (PrEP) for HIV prevention among multiple populations: A systematic review of the literature. *AIDS Behav.* 2017;21:1325-35. <https://doi.org/10.1007/s10461-016-1627-z>
15. Shubber Z, Mills EJ, Nachega JB, Vreeman R, Freitas M, Bock P, *et al.* Patient-reported barriers to adherence to antiretroviral therapy: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2016;13:e1002183. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002183>
16. Bezabhe WM, Chalmers L, Bereznicki LR, Peterson GM. Adherence to antiretroviral therapy and virologic failure: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016;95:e3361. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003361>
17. Hutter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, Allers K, *et al.* Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2009;360:692-8. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802905>
18. Gupta RK, Abdul-Jawad S, McCoy LE, Mok HP, Peppas D, Salgado M, *et al.* HIV-1 remission following CCR5Delta32/Delta32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature* 2019;568:244-8. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1027-4>

Presentación de caso

Melioidosis en Colombia, descripción de un caso clínico y consideraciones epidemiológicas

José Y. Rodríguez¹, Carlos A. Álvarez-Moreno^{2,3}, Jorge A. Cortés², Gerson J. Rodríguez¹, Kelin Esquea³, Heidy Pinzón⁴, María J. Mendoza¹, Yiceth Acosta⁵

¹ Centro de Investigaciones Microbiológicas del Cesar, Valledupar, Colombia

² Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

³ Clínica Universitaria Colombia, Clínicas Colsanitas, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Clínica Laura Daniela, Valledupar, Colombia

⁵ Clínica Médicos SA, Valledupar, Colombia

La melioidosis es una enfermedad infecciosa causada por *Burkholderia pseudomallei* cuyo diagnóstico clínico puede ser difícil debido a su variada presentación clínica y a las dificultades del diagnóstico microbiológico, por lo cual pueden requerirse técnicas moleculares para su adecuada identificación una vez se sospecha su presencia. Son pocos los antibióticos disponibles para el tratamiento de esta enfermedad y, además, deben usarse durante un tiempo prolongado. Aunque se conoce por ser endémica en Tailandia, Malasia, Singapur, Vietnam y Australia, en Colombia se han reportado algunos pocos casos.

Se presenta un caso de melioidosis en la región norte de Colombia, se hace una revisión de las características clínicas y el tratamiento, y se describe la epidemiología local de esta enfermedad.

Palabras clave: *Burkholderia pseudomallei*; melioidosis/epidemiología; informes de caso; Colombia.

Melioidosis in Colombia, description of a clinical case and epidemiological considerations

Melioidosis is an infectious disease caused by *Burkholderia pseudomallei* whose clinical diagnosis can be difficult due not only to its varied clinical presentation but also to the difficulties in the microbiological diagnosis. Thus, it may be necessary to use molecular techniques for its proper identification once it is suspected.

There are few antibiotics available for the treatment of this disease, which must be used over a long period of time. Although it is known to be endemic in Thailand, Malaysia, Singapore, Vietnam, and Australia, in Colombia there are few reported cases.

We describe a case of melioidosis in the northern region of Colombia. Additionally, we review its clinical characteristics and treatment and we describe the local epidemiology of this disease.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*; melioidosis/epidemiology; case reports; Colombia.

La melioidosis es una enfermedad infecciosa causada por *Burkholderia pseudomallei*, una bacteria saprofita del suelo (1). Esta enfermedad tiene una amplia gama de presentaciones clínicas, algunas con altas tasas de mortalidad. La melioidosis es un problema de salud pública en áreas del sudeste asiático y Australia, y se considera una enfermedad infecciosa emergente en muchos países tropicales en desarrollo, incluido Colombia (2). A continuación, se presenta un caso y se describen la epidemiología local, las características clínicas y el tratamiento de la enfermedad.

Reporte de caso

Se trata de un hombre de 56 años de edad procedente de La Loma (zona rural del municipio de El Paso, Cesar, Colombia), con antecedentes de diabetes mellitus de tipo 2 e insuficiencia renal crónica bajo tratamiento médico.

Consultó por presentar síntomas urinarios de una semana de evolución. En el momento del ingreso, tenía una temperatura de 39,5 °C y refirió sentir dolor en la percusión con el puño en ambas fosas renales.

Recibido: 08/06/18
Aceptado: 26/09/18
Publicado: 02/10/18

Citación:

Rodríguez J, Álvarez-Moreno C, Cortés J, Rodríguez G, Esquea K, Pinzón, H, *et al.* Melioidosis en Colombia, descripción de un caso clínico y consideraciones epidemiológicas. Biomédica. 2019;39(Supl.1):10-18
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4534>

Correspondencia:

José Y. Rodríguez, Centro de Investigaciones Microbiológicas del Cesar, Calle 16C N° 19D-14, Barrio Dangond, Valledupar, Colombia
Teléfono: (0575) 580 0126 - (0575) 580 6696
jyrodriquezq@gmail.com

Contribución de los autores:

José Y. Rodríguez y Gerson J. Rodríguez: manejo clínico de los pacientes
Kelín Esquea, Heidy Pinzón, Yiceth Acosta y María J. Mendoza: identificación de microorganismos
José Y. Rodríguez, Gerson J. Rodríguez, Carlos A. Álvarez-Moreno y Jorge A. Cortés: análisis de los datos clínicos, microbiológicos y moleculares
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

Financiación:

No hubo fuentes de financiación.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Los exámenes de laboratorio evidenciaron leucocitosis con anemia (leucocitos: 11,000 células/ μ l, neutrófilos: 77 %, hemoglobina: 7,9 g/dl, plaquetas: 437.000 por μ l), elevación de azoados (creatinina: 2,0 mg/dl, nitrógeno ureico en sangre: 31 mg/dl) e hiperglucemia (glucosa: 176 mg/dl). En la ecografía renal se observó hidronefrosis bilateral.

Se inició tratamiento empírico con 2,25 g de piperacilina y tazobactam intravenosos cada seis horas. Los resultados de los hemocultivos fueron negativos en el quinto día, en tanto que el urocultivo fue positivo para *B. pseudomallei*, razón por la cual se decidió cambiar el tratamiento antibiótico a 500 mg de meropenem intravenoso cada ocho horas durante diez días.

El paciente presentó una adecuada evolución clínica, por lo que se decidió continuar el manejo de forma ambulatoria con 160/800 mg de trimetoprim-sulfametoxazol cada 12 horas por vía oral durante tres meses.

Siete meses después, el paciente reingresó por infección necrosante del pie derecho asociada con fiebre alta no cuantificada, vómito en múltiples oportunidades y un episodio convulsivo. Los familiares refirieron que el paciente no se había tomado el tratamiento con trimetoprim-sulfametoxazol en la forma indicada.

Los exámenes de laboratorio evidenciaron leucocitosis y neutrofilia con anemia (leucocitos: 17.900 células/ μ l, neutrófilos: 93 %, hemoglobina: 7,5 g/dl), acidosis metabólica grave (pH: 7,328, PCO_2 : 18 mmol, HCO_3^- : 9,2 mmol; base exceso: -14,2) y elevación de azoados (creatinina: 8,9 mg/dl, nitrógeno ureico en sangre: 96 mg/dl).

El paciente fue trasladado a la unidad de cuidados intensivos para monitorear su estado hemodinámico, administrarle agentes vasopresores e iniciar hemodiafiltración venovenosa continua.

Dado el antecedente de melioidosis, se decidió iniciar el tratamiento antibiótico intravenoso con 1 g de ceftazidima y 160/800 mg de trimetoprim-sulfametoxazol cada ocho horas.

Durante la hospitalización, el paciente fue sometido a procedimientos quirúrgicos y se le amputó la falange proximal del pie derecho. Los hemocultivos, el urocultivo y el cultivo de la secreción del pie derecho fueron positivos para *B. pseudomallei*.

El paciente fue dado de alta después de 35 días de hospitalización y múltiples lavados quirúrgicos, y se le continuó administrando un tratamiento oral de consolidación con 160/800 mg de trimetoprim-sulfametoxazol cada 12 horas y 100 mg de doxiciclina cada 12 horas, durante seis meses.

Para la identificación microbiológica, se utilizó el sistema MicroScan WalkAway™ (Beckman Coulter, USA); la posterior identificación molecular permitió obtener la secuencia, la cual se ingresó en GenBank (*Burkholderia pseudomallei* strain CIMCE 006 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Accession: KY996759). A los seis meses del egreso hospitalario, el paciente no había presentado recurrencias de la enfermedad.

Discusión y revisión de la literatura

En 1992, se definió el género *Burkholderia* como separado del género *Pseudomonas* con base en las secuencias del ARN ribosómico 16S (rRNA 16S), por homología de sus valores de ADN, su composición de lípidos

celulares y ácidos grasos, y sus características fenotípicas (3). En este género, con más de 100 especies, *B. pseudomallei* (agente etiológico de la melioidosis), *B. mallei* (agente etiológico del muermo) y el complejo *B. cepacia* (compuesto, por lo menos, por 20 especies y causante de infecciones hospitalarias y pulmonares oportunistas), son las especies generalmente asociadas con la infección en seres humanos (4-6).

La melioidosis se ha descrito como endémica en el sudeste y el sur de Asia y en el norte de Australia (7,8). Se estima que hay 165.000 casos al año en todo el mundo, de los cuales 89.000 resultan fatales (2,9), y se la reconoce como una de las principales causas de muerte por neumonía y sepsis en Tailandia, Malasia, Singapur, Vietnam y Australia (10).

La aparición de *B. pseudomallei* en los Estados Unidos se ha asociado con la trata de esclavos en los siglos XVIII y XIX, dada la similitud genética entre aislamientos de África y América que sugiere que su origen se dio a partir de su introducción en el territorio continental entre 1759 y 1806 (8). Si esta teoría es correcta, la diseminación debió extenderse por toda América, especialmente en los países de habla inglesa, francesa y portuguesa, y en menor medida, en los países de habla hispana, pues los españoles limitaron el esclavismo en comparación con otros grupos de comerciantes de la época (11); además, esto coincide con los lugares de detección de casos en el continente.

Se ha presentado un incremento del número de casos por fuera de la región Asia-Pacífico, incluido el continente americano, aunque no está claro si dicho incremento refleja un aumento de la incidencia o el fortalecimiento de los laboratorios de microbiología y de los programas de búsqueda y vigilancia de esta enfermedad (12). Una revisión de los casos registrados en América entre 1947 y 2015, los ubica fundamentalmente en Centroamérica y el Caribe (41 de 95) y en Suramérica, especialmente en Brasil (28 de 95) (1).

En Colombia, la melioidosis no es una enfermedad de interés en salud pública (vigilancia activa). Sin embargo, después de Brasil, es el segundo país suramericano con más casos reportados en la literatura médica (1). El número real de casos se desconoce, probablemente como consecuencia del desconocimiento de la enfermedad por parte de los profesionales de la salud, lo que desemboca en la falta de sospecha diagnóstica. Ello se suma a la ausencia de la tecnología necesaria para su diagnóstico adecuado y al hecho de que no se reportan los casos diagnosticados, aunque en los artículos consultados se describen, por lo menos, 12 casos de melioidosis en el país (13-18).

En Valledupar (Cesar), ciudad ubicada en el norte del país (a 180 km, aproximadamente, de la línea de costa), se viene haciendo búsqueda activa de casos de melioidosis desde el 2014 y se han encontrado 15 casos (cuadro 1) provenientes de los departamentos de Cesar, Bolívar y Magdalena, los cuales comparten el territorio de la Sierra Nevada de Santa Marta, macizo montañoso aislado de la cordillera de los Andes, y forman parte de la región natural conocida como la depresión momposina (figura 1). Esta región se caracteriza por una elevada humedad debida a los grandes volúmenes de agua con los que cuenta permanentemente y a promedios de precipitación anual entre los 1.500 y los 2.000 mm.

La melioidosis afecta principalmente a personas que tienen contacto frecuente con la tierra y el agua contaminadas con *B. pseudomallei*. Las principales rutas de infección son la inoculación, la inhalación y la ingestión. Su presentación clínica, gravedad y resultados dependen de la carga bacteriana

Cuadro 1. Características epidemiológicas y demográficas, tratamiento antibiótico y resultados clínicos de los pacientes con melioidosis en Cesar

Paciente	Fecha de ingreso	Edad	Sexo	Antecedentes	Presentación	Tipo de muestra	Tratamiento	UCI	Resultado	Recurrencia
1	03/09/2014	72	M	Diabetes mellitus de tipo 2; hipertensión arterial	Neumonía con bacteriemia	Hemocultivo, urocultivo y secreción orotraqueal	I: meropenem C: TMP-SMX	Sí	Fallecido	--
2	09/08/2015	60	F	Diabetes mellitus de tipo 2; hipertensión arterial	Infección de piel y tejidos blandos y bacteriemia	Secreción de herida y hemocultivos	I: meropenem C: TMP-SMX	No	Vivo	No
3*	31/05/2016	49	M	Diabetes mellitus de tipo 2; enfermedad de Hansen: eritema nudoso leproso, uso de esteroides	Neumonía con bacteriemia	Hemocultivo	I: meropenem C: TMP/SMX	No	Vivo	No
4*	24/10/2016	71	M	Hipertensión arterial, mieloma múltiple, trasplante de médula ósea, uso de talidomida y esteroides	Neumonía con bacteriemia	Hemocultivo	I: meropenem C: TMP/SMX	No	Vivo	No
5	19/11/2016	66	M	Diabetes mellitus de tipo 2; hipertensión arterial	Neumonía con bacteriemia	Hemocultivo y secreción orotraqueal	PIP-TAZ	Sí	Fallecido	--
6*	05/12/2016	56	M	Diabetes mellitus de tipo 2	Infección de vías urinarias	Urocultivo	I: meropenem C: TMP-SMX	No	Vivo	A los 6 meses: infección de vías urinarias, bacteriemia e infección de piel y tejidos blandos
7*	19/12/2016	54	M	Posoperatorio de osteosíntesis de tibia y peroné por fractura abierta	Infección de piel y tejidos blandos	Secreción de herida	I: meropenem C: TMP-SMX	No	Vivo	No
8*	22/04/2017	51	F	Diabetes mellitus de tipo 2	Neumonía	Cultivo de esputo y lavado bronquioalveolar	I: ceftazidima C: TMP-SMX	No	Vivo	No
9	13/05/2017	3 meses	F	Prematuro de 34 semanas	Infección de vías urinarias	Urocultivo	Meropenem	No	Vivo	No
10	13/06/2017	47	M	Posoperatorio de lavado quirúrgico y desbridamiento por heridas complejas en rodilla debidas a trauma	Infección de piel y tejidos blandos	Secreción de herida	I: Meropenem C: TMP-SMX	No	Vivo	No
11	16/06/2017	79	M	Ninguno	Neumonía con bacteriemia	Hemocultivo	PIP-TAZ	Sí	Fallecido	--
12	20/06/2017	36	M	Diabetes mellitus, hipertensión arterial	Neumonía con bacteriemia	Hemocultivo	I: ceftazidima C: TMP-SMX	Sí	Vivo	No
13*	10/11/2017	3	F	Ninguno	Neumonía con bacteriemia	Hemocultivo, secreción orotraqueal	Ceftriaxona más clindamicina más claritromicina	Sí	Fallecido	--
14	01/01/2018	89	F	Ninguno	Neumonía con bacteriemia	Hemocultivo, secreción orotraqueal	PIP-TAZ	Sí	Fallecido	--
15	08/04/2018	58	M	Secuelas de trauma craneoencefálico, paciente con traqueotomía	Neumonía con bacteriemia	Hemocultivo	I: ceftazidima C: TMP-SMX y doxiciclina	Sí	Vivo	No

UCI: unidad de cuidados intensivos; I: inducción; C: consolidación; TMP/SMX: trimetoprim-sulfametoxazol; PIP/TAZ: piperacilina-tazobactam

* Identificación del microorganismo mediante biología molecular

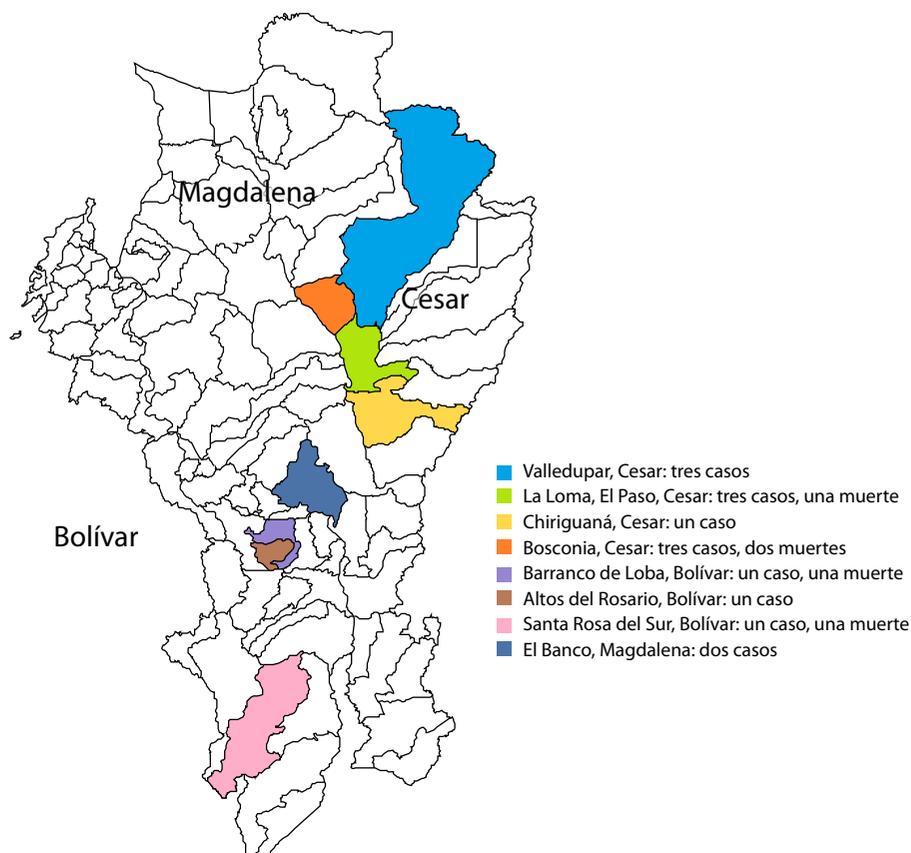


Figura 1. Procedencia y desenlace de los 15 casos de melioidosis diagnosticados en el departamento del Cesar (2014-2018)

en el momento de la exposición, la ruta de infección (inhalatoria o percutánea), la virulencia de la cepa y el estado inmunológico del individuo (19).

Entre los principales factores de riesgo de la enfermedad, se han descrito la diabetes mellitus, la enfermedad pulmonar crónica, la enfermedad renal crónica, el abuso de alcohol, la talasemia, el cáncer, el tratamiento con esteroides y otros tratamientos inmunosupresores (19,20).

Los casos de melioidosis suelen ser producto de una infección adquirida durante la temporada de lluvias y el periodo de incubación promedio es de nueve días (rango: 1 a 21 días) (21,22). El 4 % de los casos corresponde a la reactivación de un foco latente, y clínicamente se presenta en forma localizada o diseminada (19). Por su ubicación cerca de la línea del ecuador, en Colombia no hay estaciones sino temporadas de lluvia que alternan con temporadas secas. Además, algunas zonas del país presentan condiciones similares a las de los nichos ecológicos de la enfermedad en el sureste asiático y, también, cuentan con cultivos de arroz o algodón.

Los estudios serológicos demuestran que la mayoría de los pacientes con infección por *B. pseudomallei* son asintomáticos (23). La melioidosis puede presentar un amplio rango de presentaciones clínicas que simulan otras enfermedades, como el cáncer o la tuberculosis (24).

La presentación clínica más común es la neumonía (36 a 51 %), seguida por infecciones de la piel y de los tejidos blandos (13 a 33 %), infecciones

genitourinarias (7 a 14 %), bacteriemia primaria (10 a 15 %), e infecciones osteoarticulares (4 %) y neurológicas (3 a 7 %).

En más del 80 % de los casos, su presentación es aguda (menos de dos meses de evolución de los síntomas) y la neumonía se asocia con la mayor tasa de mortalidad (hasta 63 %), tres veces más que el resto de presentaciones clínicas (20,22).

La melioidosis crónica (enfermedad de más de dos meses de duración) se presenta usualmente en forma de neumonía crónica (que imita la tuberculosis) o de úlceras o abscesos de piel y tejidos blandos (19). Se han reportado diferencias regionales en la presentación clínica, por ejemplo, abscesos parotídeos en 40 % de los niños tailandeses, abscesos prostáticos hasta en 20 % de los hombres australianos o encefalitis con compromiso del tallo cerebral en 4 % de los casos en el norte de Australia (19).

La recurrencia de esta enfermedad puede presentarse en 5 a 25 % de los casos y debe considerarse en pacientes con antecedentes de melioidosis que hayan consultado por un episodio febril (20,25). Esta presentación puede ser consecuencia de una recaída, lo cual significa que no se erradicó la cepa infecciosa (75 %), o que de nuevo hay infección por la exposición a una nueva cepa (25 %). El riesgo de recurrencia se asocia con la elección, la duración y el cumplimiento del tratamiento antimicrobiano (26).

Desde el punto de vista del diagnóstico, la prueba de referencia para la melioidosis es el aislamiento de *B. pseudomallei* a partir de especímenes clínicos; sin embargo, el microorganismo no siempre se puede aislar fácilmente, por lo que se recomienda emplear medios selectivos como el agar de Ashdown (el cual no se usa de forma rutinaria y no se encuentra disponible comercialmente); además, el tiempo de incubación es prolongado (5 a 7 días) (27).

Recientemente, se han descrito nuevas técnicas para la detección rápida y barata de la bacteria, que facilitan su uso en aquellos lugares que no cuentan con la infraestructura necesaria. Entre estas, se cuenta la detección del antígeno mediante inmunocromatografía, cuyos resultados, a pesar de ser promisorios, deben validarse (28,29)

Además, aunque se logre el aislamiento, no necesariamente se puede identificar adecuadamente el microorganismo. En cuanto a su fenotipo, en *B. pseudomallei* este puede identificarse utilizando sistemas comerciales. Sin embargo, estos pueden no distinguir *B. pseudomallei* de *B. thailandensis* y de miembros del complejo *B. cepacia* (30-32) (figura 2). Asimismo, se han descrito variaciones regionales en la identificación de *B. pseudomallei* cuando se utilizan estos sistemas automatizados, probablemente como consecuencia del tipo de tarjetas y bases de datos empleadas (33). Entre estos métodos fenotípicos automatizados, el de mejor rendimiento diagnóstico es el Vitek 2™. El MALDI-TOF MS ha demostrado ser un buen método diagnóstico si se utilizan las bases de datos adecuadas (34,35). Para un diagnóstico más preciso se deben emplear métodos genotípicos basados en la secuenciación del rARN 16s y del gen *GroER* (30).

El tratamiento de esta enfermedad es prolongado. En una primera fase, se hace la inducción con ceftazidima, imipenem o meropenem intravenosos durante 10 a 14 días y, en la fase de erradicación, se emplea la administración oral de trimetoprim-sulfametoxazol, solos o en combinación con doxiciclina (36).

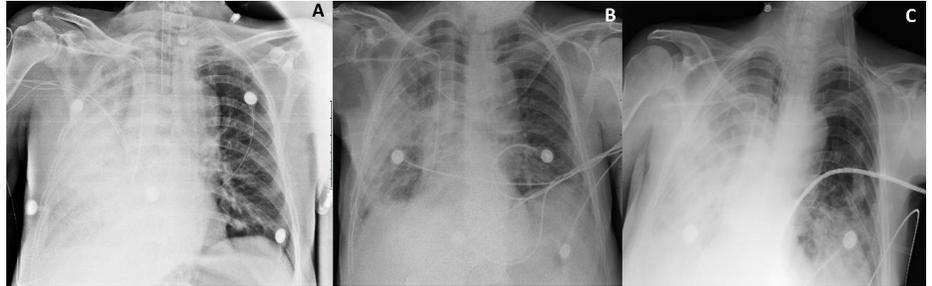


Figura 2. Radiografías de tórax. **A.** En el momento del ingreso. Se observan infiltrados alveolares predominantemente en el hemitórax derecho. **B.** En el día 15 de la estancia hospitalaria, en la que se observa disminución de los infiltrados alveolares. **C.** Progresión de los infiltrados alveolares en ambos campos pulmonares.

Dada la gravedad y la alta mortalidad de la enfermedad (30 a 47 % en la melioidosis aguda grave y 40 a 75 % en casos con sepsis) (20), así como la duración prolongada del tratamiento antimicrobiano y el escaso número de antibióticos disponibles para tratarla (37), es necesario fortalecer la vigilancia epidemiológica y la capacidad de sospecha clínica para instaurar el tratamiento más oportuno tempranamente y mejorar el resultado clínico.

Asimismo, debe contarse con herramientas diagnósticas sencillas y rápidas, como las ya descritas (por ejemplo, la inmunocromatografía), las cuales permiten un diagnóstico adecuado, especialmente en zonas potencialmente endémicas. Además, se deben fortalecer los laboratorios regionales proveyéndolos de métodos de aislamiento e identificación molecular para este germen.

Con base en los casos reportados previamente y el presentado en este estudio, y dadas las condiciones medioambientales similares a las descritas por Limmathurotsakul, *et al.* (2) es necesaria la búsqueda activa de casos en otras zonas del país, como los departamentos de Chocó, Santander y los de los Llanos Orientales.

Debe anotarse que cuando no se hace un diagnóstico oportuno por la falta de sospecha clínica y se prescribe el tratamiento antibiótico empírico para la presentación más usual, es decir, la neumonía adquirida en la comunidad, este resulta ineficaz, porque la recomendación actual para el manejo de primera línea de la neumonía en Colombia es el uso de ampicilina y sulbactam más claritromicina (38).

En conclusión, ante la presencia de este microorganismo en la región, se debe sospechar melioidosis en pacientes que presenten un cuadro clínico sugestivo de melioidosis con factores de riesgo, como contacto con el suelo o el agua, residencia en zonas agrícolas, trabajo en el sector de la construcción, personal militar, viajes de aventura y ecoturismo, o condiciones como diabetes mellitus, enfermedad pulmonar crónica, enfermedad renal crónica, consumo excesivo de alcohol, talasemia, tratamiento con esteroides y cáncer (36).

Los aislamientos microbiológicos de *B. pseudomallei* u otros miembros del género *Burkholderia*, se deben estudiar mediante más de un método de identificación microbiológica, preferiblemente los moleculares (especialmente, los sistemas Phoenix y MALDI TOF).

Por último, es necesario establecer un sistema de vigilancia activa, sobre todo en aquellas regiones de Colombia con condiciones medioambientales que favorecen la aparición de la enfermedad.

Referencias

1. Benoit TJ, Blaney DD, Doker TJ, Gee JE, Elrod MG, Rolim DB, *et al.* A review of melioidosis cases in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;93:1134-9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0405>
2. Limmathurotsakul D, Golding N, Dance DA, Messina JP, Pigott DM, Moyes CL, *et al.* Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nat Microbiol.* 2016;1:15008. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.8>
3. Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, *et al.* Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol.* 1992;36:1251-75. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1992.tb02129.x>
4. Hemarajata P, Baghdadi JD, Hoffman R, Humphries RM. *Burkholderia pseudomallei*: Challenges for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2016;54:2866-73. <https://doi.org/10.1128/JCM.01636-16>
5. Eberl L, Vandamme P. Members of the genus *Burkholderia*: Good and bad guys. *F1000Res.* 2016;5:1007. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8221.1>
6. Depoorter E, Bull MJ, Peeters C, Coenye T, Vandamme P, Mahenthiralingam E. *Burkholderia*: An update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100:5215-29. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7520-x>
7. Nasner-Posso KM, Cruz-Calderón S, Montúfar-Andrade FE, Dance DA, Rodríguez-Morales AJ. Human melioidosis reported by ProMED. *Int J Infect Dis.* 2015;35:103-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.05.009>
8. Chewapreecha C, Holden MT, Vehkala M, Välimäki N, Yang Z, Harris SR, *et al.* Global and regional dissemination and evolution of *Burkholderia pseudomallei*. *Nat Microbiol.* 2017;2:16263. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.263>
9. Currie BJ, Kaestli M. Epidemiology: A global picture of melioidosis. *Nature.* 2016;529:290-1. <https://doi.org/10.1038/529290a>
10. White NJ. Melioidosis. *Lancet.* 2003;361:1715-22. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13374-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13374-0)
11. Victoria P. Grandes mitos de la historia de Colombia. Primera edición. Bogotá: Grupo Planeta-Colombia; 2011.
12. Nasner-Posso KM, Cruz-Calderón S, Rodríguez-Morales AJ, Montúfar-Andrade FE. Melioidosis: una enfermedad esporádica o emergente en Colombia? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33:206-7. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.013>
13. Severiche D. *Pseudomonas pseudomallei* community acquired pneumonia. *Revista Colombiana de Neumología.* 1998;10:188-92.
14. Montúfar FE, Ochoa JE, Ortega H, Franco L, Montúfar MC, Monsalve A, *et al.* Melioidosis in Antioquia, Colombia: An emerging or endemic disease? A case series. *Int J Infect Dis.* 2015;37:50-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.05.023>
15. González G, Mantilla W, Rada E. Pneumonia and osteomyelitis by *Burkholderia pseudomallei*: Report of a clinical case. *Revista Med.* 2009;17:146-9.
16. Osorio HE, Durán LF. Melioidosis: reporte de un caso en el departamento del Huila - Colombia. *Revista Facultad de Salud RFS* 2014;6:56-9.
17. Rosero CH, Gómez G, Gutiérrez OI. Tos y disnea de seis años de evolución en un adulto joven con melioidosis pulmonar crónica. Reporte de caso. *Medlab* 2013;19:465-72.
18. Guzmán-Gómez L, Agudo-Bilbao M, Peiro-Callizo E, Salas C. Melioidosis importada desde Colombia a España. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33:214-6. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.06.003>
19. Currie BJ. Melioidosis: Evolving concepts in epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Semin Respir Crit Care Med.* 2015;36:111-25. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1398389>
20. Kingsley PV, Leader M, Nagodawithana NS, Tipre M, Sathiakumar N. Melioidosis in Malaysia: A review of case reports. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0005182. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005182>
21. Suputtamongkol Y, Hall AJ, Dance DA, Chaowagul W, Rajchanuvong A, Smith MD, *et al.* The epidemiology of melioidosis in Ubon Ratchatani, northeast Thailand. *Int J Epidemiol.* 1994;23:1082-90.

22. Currie BJ, Ward L, Cheng AC. The epidemiology and clinical spectrum of melioidosis: 540 cases from the 20 year Darwin prospective study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e900. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000900>
23. Wuthiekanun V, Chierakul W, Langa S, Chaowagul W, Panpitpat C, Saipan P, *et al.* Development of antibodies to *Burkholderia pseudomallei* during childhood in melioidosis-endemic northeast Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74:1074-5.
24. Vishnu Prasad NR, Balasubramaniam G, Karthikeyan VS, Ramesh CK, Srinivasan K. Melioidosis of chest wall masquerading as a tubercular cold abscess. *J Surg Tech Case Rep.* 2012;4:115-7. <https://doi.org/10.4103/2006-8808.110254>
25. Limmathurotsakul D, Peacock SJ. Melioidosis: A clinical overview. *Br Med Bull.* 2011;99:125-39. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldr007>
26. Limmathurotsakul D, Chaowagul W, Chierakul W, Stepniewska K, Maharjan B, Wuthiekanun V, *et al.* Risk factors for recurrent melioidosis in northeast Thailand. *Clin Infect Dis.* 2006;43:979-86. <https://doi.org/10.1086/507632>
27. Ranjan N, Ranjan KP. State of the globe: Melioidosis: Diagnostic caveats and emerging solutions. *J Glob Infect Dis.* 2018;10:1-2. https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_107_17
28. Shaw T, Tellapragada C, Ke V, AuCoin DP, Mukhopadhyay C. Performance evaluation of Active Melioidosis Detect-Lateral Flow Assay (AMD-LFA) for diagnosis of melioidosis in endemic settings with limited resources. *PLoS One.* 2018;13:e0194595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194595>
29. Woods KL, Boutthasavong L, NicFhogartaigh C, Lee SJ, Davong V, AuCoin DP, *et al.* Evaluation of a rapid diagnostic test for the detection of *Burkholderia pseudomallei* in the Lao People's Democratic Republic. *J Clin Microbiol.* 2018;56:e02002-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.02002-17>
30. Lau SKP, Sridhar S, Ho C-C, Chow W-N, Lee K-C, Lam C-W, *et al.* Laboratory diagnosis of melioidosis: Past, present and future. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015;240:742-51. <https://doi.org/10.1177/1535370215583801>
31. Kiratisin P, Santanirand P, Chantratita N, Kaewdaeng S, Jordan JG, Cook EC, *et al.* Accuracy of commercial systems for identification of *Burkholderia pseudomallei* versus *Burkholderia cepacia*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;59:277-81. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.013>
32. Zong Z, Wang X, Deng Y, Zhou T. Misidentification of *Burkholderia pseudomallei* as *Burkholderia cepacia* by the VITEK 2 system. *J Med Microbiol.* 2012;61:1483-4. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.041525-0>
33. Podin Y, Kaestli M, McMahon N, Hennessy J, Ngian HU, Wong JS, *et al.* Reliability of automated biochemical identification of *Burkholderia pseudomallei* is regionally dependent. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3076-8. <https://doi.org/10.1128/JCM.01290-13>
34. Walewski V, Méchaï F, Billard-Pomares T, Juguet W, Jauréguy F, Picard B, *et al.* MALDI-TOF MS contribution to diagnosis of melioidosis in a nonendemic country in three French travellers. *New Microbes and New Infections.* 2016;12:31-4. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.04.004>
35. Wang H, Chen Y-L, Teng S-H, Xu Z-P, Xu Y-C, Hsueh P-R. Evaluation of the bruker biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *Front Microbiol.* 2016;7:415. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00415>
36. Kingsley PV, Arunkumar G, Tipre M, Leader M, Sathiakumar N. Pitfalls and optimal approaches to diagnose melioidosis. *Asian Pac J Trop Med.* 2016;9:515-24. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.04.003>
37. Rhodes KA, Schweizer HP. Antibiotic resistance in *Burkholderia* species. *Drug Resist Updat.* 2016;28:82-90. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.07.003>
38. Montúfar FE, Varón FA, Giraldo LF, Sáenz OA, Rodríguez A, Alarcón AM, *et al.* Recomendaciones para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la neumonía adquirida en la comunidad en adultos inmunocompetentes. *Infectio.* 2013;17(Supl.1):1-38. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(13\)70019-5](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(13)70019-5)

Artículo original

Caracterización epidemiológica de la infección por *Leptospira* spp. en caballos de trabajo y en personas ocupacionalmente expuestas en seis unidades de la Policía Nacional de Colombia

Juan Camilo Calderón^{1,2}, Miryam Astudillo³, Marlyn H. Romero⁴

¹ Maestría en Salud Pública, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia; Policía Nacional de Colombia, Manizales, Colombia

² Escuela de Ciencias Básicas, Universidad del Valle, Cali, Colombia

³ Grupo CIENVET, Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia

Introducción. Los caballos de trabajo de la Policía Nacional tienen un estrecho contacto con sus manejadores y la población en general durante las actividades recreativas y de patrullaje, lo cual puede favorecer la transmisión de la leptospirosis en los caballos y el personal ocupacionalmente expuesto.

Objetivo. Caracterizar epidemiológicamente la leptospirosis mediante pruebas de serología, urocultivo y reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) en caballos de trabajo y personal con riesgo ocupacional pertenecientes a seis unidades de la Policía Nacional de Colombia.

Materiales y métodos. Se evaluaron 153 caballos machos castrados y 123 personas en las seis unidades en los municipios de Manizales, Pereira, Armenia, Ibagué, Tuluá y Cali. Se utilizaron tres formatos estructurados para recabar información y se obtuvieron muestras sanguíneas de las personas y de los caballos, las cuales se procesaron con la prueba de aglutinación microscópica (*Macroscopic Agglutination Test*, MAT) para 24 serogrupos. Se practicó el examen clínico de los caballos y se obtuvieron muestras de orina para el urocultivo y la PCR convencional.

Resultados. La seroprevalencia de *Leptospira* spp. fue de 3,25 % (n=4) en las personas y de 85 % (n=130) en los caballos. Entre los caballos, los serogrupos Djasiman y Shermani fueron los más prevalentes. El urocultivo fue positivo en el 64,7 % (99/153) de las muestras, en tanto que los análisis de PCR fueron negativos. Se encontró una asociación estadísticamente significativa de la frecuencia de salida de las instalaciones (p=0,009) y la presencia de fauna silvestre (p=0,051) con la infección por el serogrupo Shermani.

Conclusión. Las características epidemiológicas de la leptospirosis en los caballos sugieren una presentación endémica de la infección y su papel como reservorios de la bacteria; sin embargo, debe dilucidarse la patogenia de la enfermedad con estudios complementarios.

Palabras clave: *Leptospira*; leptospirosis/epidemiología; estudios seroepidemiológicos; factores de riesgo; caballos; pruebas de aglutinación; reacción en cadena de la polimerasa.

Epidemiological characterization of *Leptospira* spp. infection in working horses and in an occupationally exposed population in six Colombian police stations

Introduction: Police working horses are in close contact with their managers and the general population during recreational and patrol activities, which can favor the transmission of leptospirosis among the horses and the occupationally exposed personnel.

Objective. To characterize epidemiologically leptospirosis through serology, urine culture and PCR in working horses and in the occupationally exposed population in six police stations in Colombia.

Materials and methods. We tested 153 castrated male horses and 123 people in six police stations in the municipalities of Manizales, Pereira, Armenia, Ibagué, Tuluá, and Cali. Three structured formats were applied and blood samples were obtained from people and horses, which were processed with the *Macroscopic Agglutination Test*, (MAT) for 24 serogroups. Horses were subject to a clinical examination, and urine samples were obtained for urine culture and conventional PCR.

Results. The seroprevalence of human *Leptospira* spp. was 3.25% (n=4) while in horses it was 85% (n=130). Among the horses, serogroups Djasiman and Shermani were the most prevalent. The urine culture was positive in 64.7% (99/153) of the samples, whereas PCR analyzes were negative. A statistically significant association was found between the frequency of exiting the facilities (p=0.009) and the presence of wildlife (p=0.0051) with the infection by serogroup Shermani.

Recibido: 01/05/18

Aceptado: 30/07/18

Publicado: 31/07/18

Citación:

Calderón JC, Astudillo M, Romero M. Caracterización epidemiológica de la infección por *Leptospira* spp. en caballos de trabajo y en personas ocupacionalmente expuestas en seis unidades de la Policía Nacional de Colombia. *Biomédica*. 2019;39(Supl.1):19-34
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i1.4475>

Correspondencia:

Marlyn H. Romero, Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Calle 26 N° 66-10, Manizales, Colombia
Teléfono: (576) 878 1500
marlyn.romero@ucaldas.edu.co

Contribución de los autores:

Juan Camilo Calderón: recolección de la información, análisis de laboratorio y estadístico
Miryam Astudillo: mantenimiento de las cepas de leptospirosis y validación de las pruebas de laboratorio
Marlyn H. Romero: dirección del proyecto, apoyo en la metodología y análisis estadístico
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

Financiación:

Este estudio fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones y Posgrados de la Universidad de Caldas, por la Universidad del Valle, el Proyecto de Formación de Talento Humano de Alto Nivel del Tolima y la Policía Nacional de Colombia.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Conclusion. The epidemiological characteristics of leptospirosis in horses suggest an endemic presentation of the infection and its role as reservoirs of the bacteria; however, it is necessary to elucidate the pathogenesis of the disease with complementary studies.

Key words: *Leptospira*; leptospirosis/epidemiology; seroepidemiologic studies; risk factors; horses; agglutination test; polymerase chain reaction.

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución global e importancia en salud pública (1). La seroprevalencia de la enfermedad en muchas partes del mundo se asocia con la infección renal crónica de una variedad de especies de animales domésticos, peridomésticos y de reservorios silvestres (2). El conocimiento de los serogrupos y los serovares prevalentes en un área es esencial para entender la epidemiología de la leptospirosis y adoptar medidas efectivas de control y erradicación de la enfermedad (3).

Los caballos tienen gran importancia económica y social en algunas partes del mundo por su papel en actividades como el transporte de carga y de pasajeros, el apoyo en las actividades agrícolas, la recreación, la ayuda en tratamientos médicos y el trabajo policial, entre otras actividades (4).

En algunos estudios recientes, se sugiere que la infección por *Leptospira* spp. en caballos se presenta en todo el mundo e involucra un amplio rango de serovares (2). La mayoría de las infecciones son de carácter subclínico y los animales pueden tener infección crónica de por vida (5). Cuando la enfermedad se manifiesta, los caballos presentan uveítis, abortos, nacimientos prematuros, mortinatos, problemas respiratorios, y disfunción hepática o renal (6). A diferencia de los animales, los seres humanos son huéspedes accidentales y adquieren la bacteria por contacto con fuentes ambientales infectadas (agua o suelo), o con animales silvestres y domésticos y sus secreciones, principalmente orina, o por la exposición ocupacional (7).

Los estudios serológicos en caballos son numerosos y han permitido establecer la exposición a las leptospirosis y sus diferentes serovares (8). Además, es posible relacionar la serorreacción con signos clínicos como la uveítis y la inflamación no granulomatosa del iris, así como evaluar el riesgo de desarrollar ceguera (9).

Por su parte el urocultivo, una técnica de poca sensibilidad, pero de gran especificidad, tiene limitaciones por la dificultad de *Leptospira* spp. para crecer en medios artificiales y la probabilidad de contaminación del cultivo (10), cuyo crecimiento requiere que la bacteria esté presente con suficiente densidad en la muestra biológica, lo cual depende del grado de colonización renal y de la excreción permanente, condiciones que no se cumplen en todos los casos de infección renal (10).

La PCR se considera una prueba de gran sensibilidad y especificidad (11). La amplificación de los genes *16S* o *23S* rARN se han empleado en estudios de leptospirosis patógenas y saprofitas y en la detección rápida de la bacteria en un estadio temprano de la infección por la fácil obtención de los resultados y la posibilidad de usar diversos tipos de muestras (sangre, orina, humor acuoso o tejidos) (12,13). Sin embargo, esta técnica no identifica el serovar causante de la infección, aspecto que tiene un gran valor epidemiológico (14).

En Colombia, la leptospirosis humana es una enfermedad de notificación obligatoria en el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) (15). La seroprevalencia de la leptospirosis humana en el país oscila entre el 6 y el 75,8 % en la población general y en la ocupacionalmente expuesta (15,16). En tres estudios de caballos, uno en la Sabana de Bogotá, uno en Santander

y otro en la región del Meta y el Guaviare, se registraron seroprevalencias entre el 40,4 y el 76,6 % (17).

Los caballos usados para el trabajo policial viven en estrecho contacto con sus manejadores y con la población general, durante las actividades recreativas, de patrullaje y de control del orden público. Asimismo, son trasladados a diferentes unidades como apoyo en actividades con otros caballos, lo que aumenta el riesgo de exposición a *Leptospira* spp. y los convierte en una fuente de infección para humanos y otros animales propensos a la infección (18).

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue caracterizar la epidemiología de la leptospirosis mediante serología, urocultivo y PCR convencional en caballos de trabajo y en la población con riesgo ocupacional en seis unidades de policía de Colombia, y evidenciar el papel potencial de los caballos en la transmisión de este microorganismo.

Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio de prevalencia, el cual fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Caldas (Acta N° 011 de junio de 2016 del Comité de Bioética y Acta N° 02 de junio de 2016 del Comité de Ética para la Experimentación con Animales). Asimismo, el estudio se ajustó a lo establecido en las normas éticas para el manejo de animales de laboratorio de la Ley 84 de 1989 y el Decreto 2257 de 1986.

Se obtuvo la autorización de la Policía Nacional para la toma de las muestras biológicas de los caballos y el consentimiento informado de los participantes en este mismo sentido.

Localización geográfica

La Policía cuenta con 25 unidades policiales en el territorio nacional, en las cuales se mantienen 2.700 caballos. De estas, se seleccionaron 6 (24 %) cuyas características climáticas (clima cálido y condiciones húmedas) favorecen la supervivencia de las leptospirosis y que presentaban antecedentes previos de serorreacción (14).

Se evaluaron las unidades de los municipios de Manizales (altura de 2.170 m.s.n.m., temperatura media anual de 17 °C y precipitación anual de 2.358 mm), Pereira (altura de 1.411 m.s.n.m., temperatura media anual de 28 °C y precipitación anual de 2.750 mm), Armenia (altura de 1.229 m.s.n.m., temperatura media anual de 22 °C y precipitación anual de 2.164 mm), Ibagué (altura de 928 m.s.n.m., temperatura media anual de 24 °C y precipitación anual de 1.691 mm), Tuluá (altura de 960 m.s.n.m., temperatura media anual de 24 °C y precipitación anual de 1.300 mm) y Cali (altura de 985 m.s.n.m., temperatura media anual de 24 °C y precipitación anual de 1.483 mm) (figura 1).

Población de estudio y tamaño de la muestra

La población de estudio incluyó 267 personas (carabineros, preparadores, enfermeros y cuidadores de los caballos) y 263 caballos (machos castrados; en las unidades seleccionadas no había hembras) destinados a las labores de patrullaje rural y urbano y de diferentes razas (silla argentino, percherón, belga, pura sangre inglés, silla francés, criollo colombiano y cruces de estas razas), con edades entre los 4 y los 23 años.

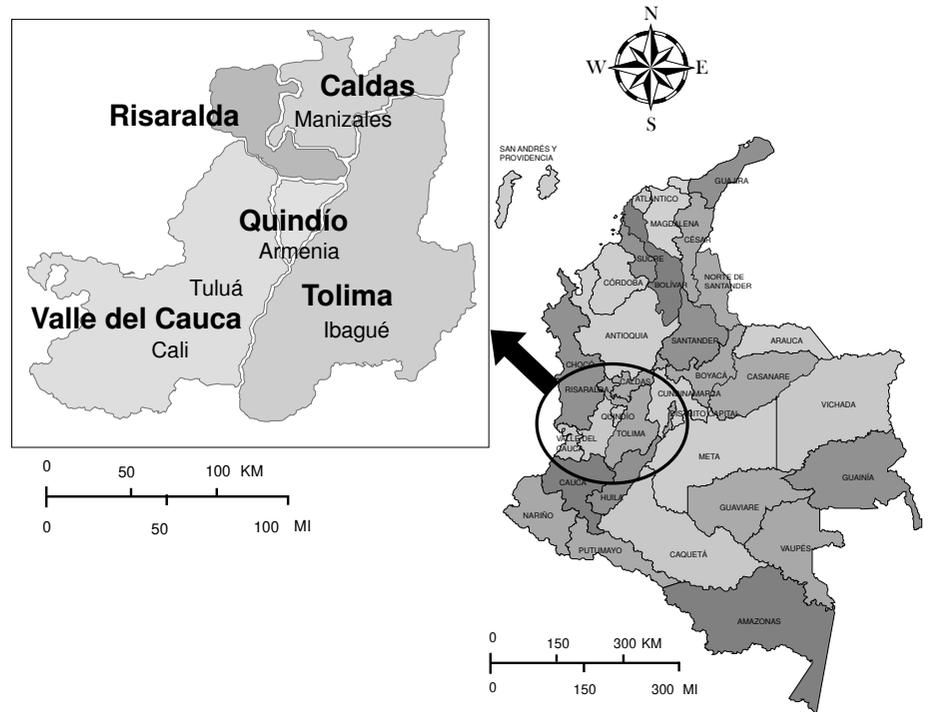


Figura 1. Localización geográfica de las unidades policiales incluidas en el estudio

Las muestras se seleccionaron de forma aleatoria, estratificada y proporcional, tomando como referencia seroprevalencias nacionales de infección del 18 % en humanos (n=123) (16,17) y de 40 % en caballos (n=153) (18). En ambos casos, se consideró un error y una significación del 5 %.

Las fórmulas utilizadas para los cálculos se presentan a continuación (19).

Para el tamaño de muestra:

$$n = \frac{\left(\frac{\sum_{h=1}^H W_h \sqrt{p_h q_h}}{\delta^2 / z^2}\right)^2}{1 + \frac{1}{N \delta^2 / z^2} \sum_{h=1}^H W_h p_h q_h}$$

donde z corresponde al valor de Z que deja un área a la derecha, al tamaño del error: al peso del estrato = N_h/N , N el tamaño de la población, n al tamaño de la muestra, p_h a la proporción del estrato, y q_h a $(1 - p_h)$, y

para la distribución por estratos:

$$n_h = n \frac{W_h \sqrt{p_h q_h}}{\sum_{h=1}^H W_h \sqrt{p_h q_h}}$$

Los criterios de inclusión de los humanos fueron tener contacto directo con los caballos durante sus labores y llevar laborando en las remontas no menos de tres meses. Se excluyeron aquellos caballos que habían permanecido en la remonta por menos de tres meses, período necesario para que los resultados de las pruebas diagnósticas usadas en el estudio evidenciaran el contacto entre las personas y los caballos de cada unidad policial, ya que los títulos de anticuerpos aparecen en los animales siete días después de los primeros síntomas (14).

Examen clínico

Un médico veterinario especialista en medicina equina examinó detenidamente a los caballos al inicio del estudio y revisó de forma exhaustiva las historias clínicas con los reportes de los últimos dos años para establecer si se habían hecho exámenes de laboratorio y si se habían presentado síntomas relacionados con la leptospirosis (6,9). Esta información se consignó en un formato que fue validado mediante una prueba piloto en la unidad policial de Cali y por expertos en leptospirosis.

Factores de riesgo

Se utilizaron dos formatos estructurados y validados. En el primero, se evaluaron las variables demográficas y sanitarias, el manejo de los caballos y la presencia de especies silvestres, mediante visitas a las instalaciones, observación directa y entrevistas al personal responsable. El segundo fue un cuestionario dirigido a los participantes en el estudio para conocer su edad, el cargo, el contacto con fluidos de los caballos, las normas de bioseguridad y las conductas de manejo de los animales según los parámetros establecidos a partir de consultas con profesores expertos de la Universidad de Caldas, así como de la prueba piloto desarrollada en la unidad policial de Cali.

Muestras sanguíneas y prueba de microaglutinación

Se obtuvieron 5 ml de sangre por punción de la vena yugular de los caballos y de la cefálica de los humanos, que luego se centrifugaron durante cinco minutos a 3.500 rpm. Los sueros se almacenaron a 2 °C para el transporte al laboratorio y se congelaron a -5 °C hasta el momento del análisis, efectuado 15 días después del muestreo.

Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Diagnóstico de Leptospirosis de la Universidad del Valle en Cali. En el mantenimiento de las cepas y el manejo de la técnica de microaglutinación (MAT), se siguieron los parámetros convencionales (17), utilizando un cepario de referencia suministrado por el laboratorio internacional de referencia para el diagnóstico de la leptospirosis del *Royal Tropical Institute* (Ámsterdam, Holanda).

Se consideraron como positivos los sueros de los humanos con títulos iguales o mayores de 1:160 y, para los caballos, aquellos sueros con títulos iguales o mayores de 1:100 (20). El grado de reacción se estableció estimando los porcentajes de leptospiras que aglutinaron.

Urocultivo

Las muestras de orina de los caballos se obtuvieron en las remontas siguiendo estrictas normas de bioseguridad. Se indujo la micción, se recolectaron 15 ml y se obtuvo una alícuota de 1 ml que se cultivó de inmediato en el medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (17) (Becton Dickinson and Company, Difco) (21).

Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en neveras de icopor, para protegerlas de la luz solar. En el laboratorio, se incubaron a 30 °C, durante un período máximo de cuatro meses hasta el momento en que las espiroquetas se observaron al microscopio. Las muestras cultivadas se sembraron de nuevo en el medio de cultivo de EMJH, y se agregaron 500 µl del cultivo primario y 1 % de 5-fluorouracilo.

Sin tener en cuenta el resultado de la lectura, se hicieron siembras para controlar la contaminación bacteriana y favorecer el crecimiento de las espiroquetas. Se hicieron observaciones semanales bajo el microscopio de campo oscuro (Nikon BH2) tomando 10 µl del cultivo y visualizando toda la placa para verificar la presencia de espiroquetas. La prueba se consideró positiva pasadas 16 semanas si se observaban, como mínimo, cuatro espiroquetas por placa en alguno de los urocultivos (2).

Reacción en cadena de la polimerasa

Se obtuvo 1 ml del urocultivo y se siguieron las instrucciones del QIAamp DNA Mini Kit™ (Qiagen). Se hizo una PCR convencional simple utilizando los iniciadores descritos por Levett (11): LipL32/270f (5'-CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT-3') y LipL32/692R (5'-CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT-3'), dirigidos a una región ubicada entre las posiciones 270 y 692 del gen *lipL32*, el cual codifica para la lipoproteína de membrana LipL32, siguiendo los lineamientos descritos por Moreno, *et al.* (22).

Se usó como control positivo *Leptospira interrogans*, serovar Canicola, cepa Hond Utrecht IV (77.8 ng/µl), y como controles negativos, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*, suministrados por el área de bacteriología del Laboratorio de Microbiología de la Universidad del Valle.

Análisis estadístico

Se hizo un estudio descriptivo para analizar las variables consideradas como factores de riesgo. Se estableció la seroprevalencia de la infección en las dos poblaciones estudiadas y se hizo un análisis de regresión logística bivariada que asumió, como variable de respuesta binomial, los resultados de la prueba MAT, donde 0 correspondió a los sueros con resultados negativos y 1 a los sueros positivos. Además, se hizo la prueba de bondad de ajuste del modelo obtenido mediante la prueba de Hosmer y Lemeshow.

Los efectos de las variables de predicción del resultado positivo o negativo de la prueba, se expresaron mediante razones de disparidad (OR) y sus respectivos intervalos de confianza del 95 %. Los valores de p menores de 0,05 se consideraron como significativos. El modelo para humanos consideró todos los serogrupos positivos en la prueba MAT; en los caballos, se hicieron dos análisis para los serogrupos más prevalentes en las remontas (Shermani y Djasiman). El análisis se efectuó utilizando el programa Stata™, versión 13.0 (College Station, Texas, USA).

Resultados

Examen clínico

El 83,7 % (128/153) de los caballos tenía una condición corporal normal, el 10,5 % (16/153) estaba delgado, el 4,5 % (7/153) tenía sobrepeso y el 1,3 % (2/153) estaba caquéctico.

En el examen clínico, el 10,5 % (16/153) de los caballos presentó alteraciones en el sistema tegumentario, pues se encontraron laceraciones (63 %), costras y alopecia (37 %), además de afecciones oculares (6,5 %, 10/153), como atrofia (10 %), queratitis (10 %), opacidad corneal (50 %), epífora y uveítis (30 %). Por último, se presentaron trastornos en el sistema locomotor

en el 5,9 % (9/153) de los ejemplares, y se observaron claudicaciones (44 %), hormiguillos (22 %), linfangitis (11 %) e inflamaciones osteoarticulares (22 %).

Antecedentes clínicos de los caballos

En la evaluación de los antecedentes en las historias clínicas, en el 84,3 % (129/153) de los caballos no se habían reportado signos relacionados con un cuadro clínico de leptospirosis (fiebre, anorexia, anemia petequeial, ictericia o intolerancia al ejercicio) (2). El 8,5 % (13/153) había presentado fiebre, el 4,6 % (7/153), decaimiento, el 0,7 % (1/153), pérdida de peso crónica o disuria y el 5,9 % (9/153) había tenido trastornos oculares.

Seroprevalencia en humanos

La seroprevalencia de leptospirosis humana fue de 3,25 % (4/123) (IC_{95%} 2-4,5): dos casos de la remonta de Cali, con títulos de 1:160 (serotipos Canicola, Panamá y Shermani) y los dos restantes de Pereira (serotipos Grippotyphosa, Bataviae, Autumnalis y Sejroe), con títulos entre 1:160 y 1:2.560. Las coaglutinaciones entre los serovares fue de 1,6 % (2/123).

Seroprevalencia en caballos

La seroprevalencia general establecida mediante la prueba MAT en los caballos fue del 85 % (130/153) (IC_{95%} 79-91). En la figura 2 se presenta la distribución de la serorreacción de los anticuerpos contra *Leptospira* spp. de los caballos en las seis unidades policiales estudiadas. El 7,8 % (n=12) de los sueros fue reactivo a un solo serogrupo y el resto presentó títulos frente a dos o más serogrupos. El 62 % de los sueros presentó títulos de 800 o mayores. No se encontraron diferencias significativas entre las seroprevalencias (p=0,979). Los serogrupos encontrados en los caballos se muestran en los cuadros 1 y 2.

Urocultivo

La frecuencia hallada en el urocultivo fue de 64,7 % (99/153) (IC_{95%}: 57-72). Se observaron espiroquetas en todas las remontas: en Tuluá, 83,3 % (15/18); en Pereira, 80 % (16/20); en Ibagué, 69,5 % (16/23); en Manizales, 63,4 % (26/41); en Armenia, 53,3 % (8/15), y en Cali, 50 % (18/36), sin que se registraran diferencias significativas (p=0,921).

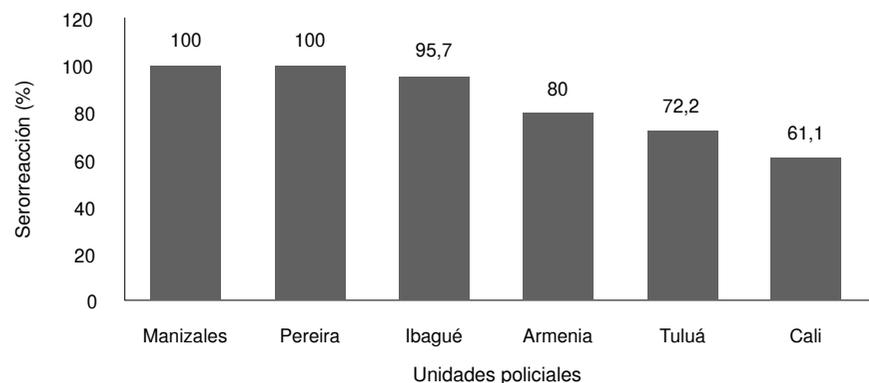


Figura 2. Serorreacción de los anticuerpos de los caballos contra *Leptospira* spp. en seis unidades de la Policía Nacional de Colombia

Cuadro 1. Seroprevalencia (P) de serogrupos de *Leptospira* spp. en caballos de las remontas de Cali (n=122), Tuluá (n=88) y Armenia (n=73), Colombia

Serogrupos	Cali*		Tuluá*		Armenia*	
	Número de títulos (≥1:100)	p (%) IC _{95%}	Número de títulos (≥1:100)	p (%) IC _{95%}	Número de títulos (≥1:100)	p (%) IC _{95%}
Djasiman	14	11,5 (5,8-17,1)	9	10,2 (3,9-16,6)	8	11,0 (3,8-18,1)
Pomona	12	9,8 (4,6-15,1)	7	8,0 (2,3-13,6)	7	9,6 (2,8-16,3)
Hebdomadis	11	9,0 (3,9-14,1)	6	6,8 (1,6-12,1)	4	5,5 (0,3-10,7)
Autumnalis	10	8,2 (3,3-14,1)	7	8,0 (2,3-13,6)	4	5,5 (0,3-10,7)
Canicola	7	5,7 (1,6-9,9)	6	6,8 (1,6-12,1)	5	6,8 (1,1-12,6)
Hurstbridge	9	7,4 (2,7-12,0)	5	5,7 (0,8-10,5)	4	5,5 (0,3-10,7)
Cynopteri	8	6,6 (2,2-10,9)	5	5,7 (0,8-10,5)	4	5,5 (0,3-10,7)
Louisiana	10	8,2 (3,3-13,1)	4	4,5 (0,2-8,9)	3	4,1 (0,4-8,7)
Panama	8	6,6 (2,2-10,9)	3	3,4 (0-7,2)	6	8,2 (1,9-14,5)
Australis	5	4,1 (7,6-0,6)	3	3,4 (0-7,2)	3	4,1 (0,4-8,7)
Semarang	2	1,6 (0-3,9)	6	6,8 (1,6-12,1)	4	5,5 (0,3-10,7)
Ballum	4	3,3 (0,1-6,4)	2	2,3 (0-5,4)	4	5,5 (0,3-10,7)
Bataviae	4	3,3 (0,1-6,4)	4	4,5 (0-8,9)	1	1,4 (0-4,0)
Tarassovi	1	0,8 (0-2,4)	5	5,7 (0-10,5)	3	4,1 (0,4-8,7)
Shermani	1	0,8 (0-2,4)	5	5,7 (0-10,5)	3	4,1 (0,4-8,7)
Manhao	3	2,5 (0-5,2)	2	2,3 (0-5,4)	2	2,7 (0-6,5)
Sarmin	3	2,5 (0-5,2)	3	3,4 (0-7,2)	1	1,4 (0-4,0)
Grippotyphosa	3	2,5 (0-5,2)	2	2,3 (0-5,4)	1	1,4 (0-4,0)
Pyrogenes	1	0,8 (0-2,4)	2	2,3 (0-5,4)	2	2,7 (0-6,5)
Celledoni	1	0,8 (0-2,4)	2	2,3 (0-5,4)	1	1,4 (0-4,0)
Ranarum	2	1,6 (0-3,9)	0	0,0 (0-0)	2	2,7 (0-6,5)
Icterohaemorrhagiae	2	1,6 (0-3,9)	0	0,0 (0-0)	0	0,0 (0-0)
Mini	1	0,8 (0-2,4)	0	0,0 (0-0)	0	0,0 (0-0)
Sejroe	0	0,0 (0-0)	0	0,0 (0-0)	1	1,4 (0-4,0)

* Número de títulos positivos para todos los serogrupos evaluados (desde 100 hasta 3.200)

IC: intervalo de confianza del 95 %

Reacción en cadena de la polimerasa

Se obtuvo una amplificación de 423 pb para un fragmento de *LipL32* en el control positivo de *L. interrogans* serovar Canicola cepa Hond Utrecht IV, en tanto que las muestras de los controles negativos no tuvieron reacciones. Sin embargo, no se obtuvieron reacciones específicas para el gen *LipL32* en ninguno de los urocultivos.

Factores de riesgo en humanos

El personal evaluado tenía contacto permanente con los caballos y el 87,6 % (n=108) usaba barreras de protección personal, como guantes, tapabocas y estrictas normas de bioseguridad. Tres de las cuatro personas que presentaron títulos contra *Leptospira* spp. tenían contacto con fluidos de los caballos, pero no se encontró ninguna asociación entre la infección y las variables incluidas en el análisis (cuadro 3).

Cuadro 2. Seroprevalencia de serogrupos de *Leptospira* spp. en caballos de remontas de Manizales (n=401), Ibagué (n=199) y Pereira (n=163), Colombia

Serogrupos	Manizales*		Ibagué*		Pereira*	
	Número de títulos (≥1:100)	p (%) IC _{95%}	Número de títulos (≥1:100)	p (%) IC _{95%}	Número de títulos (≥1:100)	p (%) IC _{95%}
Shermani	32	8,0 (5,3-10,6)	17	8,5 (4,7-12,4)	15	9,2 (4,8-13,6)
Tarassovi	32	8,0 (5,3-10,6)	15	7,5 (3,9-11,2)	15	9,2 (4,8-13,6)
Djasiman	30	7,5 (4,9-10,1)	18	9,0 (5,1-13,0)	13	8,0 (3,8-12,1)
Hurstbridge	33	8,2 (5,5-10,9)	14	7,0 (3,5-10,6)	11	6,7 (2,9-10,6)
Semarang	28	7,0 (4,5-9,5)	13	6,5 (3,1-10,0)	13	8,0 (3,8-12,1)
Hebdomadis	29	7,2 (4,7-9,8)	13	6,5 (3,1-10,0)	8	4,9 (1,6-8,2)
Cynopteri	27	6,7 (4,3-9,2)	14	7,0 (3,5-10,6)	9	5,5 (2,0-9,0)
Australis	25	6,2 (3,9-8,6)	11	5,5 (2,4-8,7)	9	5,5 (2,0-9,0)
Autumnalis	21	5,2 (3,1-7,4)	8	4,0 (1,3-6,7)	8	4,9 (1,6-8,2)
Pomona	16	4,0 (2,1-5,9)	13	6,5 (3,1-10,0)	8	4,9 (1,6-8,2)
Panama	17	4,2 (2,3-6,2)	11	5,5 (2,4-8,7)	6	3,7 (0,8-6,6)
Canicola	15	3,7 (1,9-5,6)	9	4,5 (1,6-7,4)	6	3,7 (0,8-6,6)
Pyrogenes	15	3,7 (1,9-5,6)	5	2,5 (0,3-4,7)	10	6,1 (2,5-9,8)
Louisiana	13	3,2 (1,5-5,0)	8	4,0 (1,3-6,7)	4	2,5 (0,1-4,8)
Ballum	10	2,5 (1,0-4,0)	5	2,5 (0,3-4,7)	6	3,7 (0,8-6,6)
Sarmin	12	3,0 (1,3-4,7)	5	2,5 (0,3-4,7)	6	3,7 (0,8-6,6)
Bataviae	12	3,0 (1,3-4,7)	6	3,0 (0,6-5,4)	3	1,8 (0-3,9)
Ranarum	12	3,0 (1,3-4,7)	5	2,5 (0,3-4,7)	2	1,2 (0-2,9)
Mini	7	1,7 (0,5-3,0)	5	2,5 (0,3-4,7)	3	1,8 (0-3,9)
Manhao	5	1,2 (0,2-2,3)	2	1,0 (0-2,4)	4	2,5 (0,1-4,8)
Grippotyphosa	4	1,0 (0-2,0)	0	0,0 (0-0)	1	0,6 (0-1,8)
Icterohaemorrhagiae	2	0,5 (0-1,2)	1	0,5 (0-1,5)	1	0,6 (0-1,8)
Sejroe	2	0,5 (0-1,2)	1	0,5 (0-1,5)	1	0,6 (0-1,8)
Celledoni	2	0,5 (0-1,2)	0	0,0 (0-0)	1	0,6 (0-1,8)

* Número de títulos positivos para todos los serogrupos evaluados (desde 100 hasta 3.200)

IC: intervalos de confianza del 95 %

Factores de riesgo en caballos

Leptospira Shermani fue el serogrupo más prevalente en las remontas de Manizales, Ibagué y Pereira. Los animales de fauna silvestre reportados por el personal en las remontas fueron zarigüeyas (*Didelphimorphia*), zorrillos (*Mephitidae*), armadillos (*Dasypodidae*), conejos (*Oryctolagus cuniculus*), ardillas (*Sciurus vulgaris*), iguanas (*Iguana iguana*) y serpientes, cuyos ejemplares no se capturaron y no se sometieron a ningún procedimiento. La evaluación de los factores de riesgo asociados al serogrupo Shermani se presenta en el cuadro 4.

El serogrupo de mayor seroprevalencia para las remontas de Cali, Tuluá y Armenia, fue el Djasiman y los resultados del análisis logístico binario de la infección por dicho serogrupo se presentan en el cuadro 5.

Cuadro 3. Análisis de regresión logística binaria de las variables evaluadas en la población humana positiva para *Leptospira* spp. en remontas de seis municipios colombianos

Variable	n	Títulos \geq 1:100 n (%)	p	OR	IC _{95%}
Sexo					
Masculino	116	3 (2,6)	0,135	0,2	0,0-1,8
Femenino	7	1 (14,2)			
Edad (años)					
24-30	47	1 (2,1)	0,428	0,9	0,7-1,1
31-37	49	3 (6,1)			
38-55	27	0			
Cargo					
Médico veterinario	3	0	1,00	1,0	0,8-1,2
Enfermero veterinario	9	0			
Preparador	2	0			
Carabinero	86	3 (3,5)			
Auxiliar de remonta	7	1 (14,2)			
Herrero	9	0			
Servicio de caballada	7	0			
Tiempo en la unidad en la que labora (años)					
1-6	89	3 (3,4)	0,892	1,0	0,8-1,2
7-13	26	1 (3,8)			
\geq 14	8	0			
Contacto con fluidos de los caballos					
Sí	105	3 (2,8)	0,558	2,0	0,2-20,4
No	18	1 (5,5)			
Uso de medidas de bioseguridad					
Sí	107	4 (3,7)	0,999	1,0	0,8-1,2
No	16	0			
Baño reciente en un río					
Sí	37	3 (8,1)	0,086	0,133	0,0-1,3
No	86	1 (1,2)			
Presencia de perros en casa					
Sí	63	3 (4,8)	0,355	0,339	0,0-3,4
No	60	1 (1,7)			

IC: intervalos de confianza; OR: razón de disparidad

Discusión

A pesar de que los reportes de la transmisión de leptospiras patógenas de los caballos a otros animales y al ser humano son escasos, la seropositividad sí es frecuente, con valores altos y títulos variables según los diferentes serotipos (13), lo cual se confirmó en el presente trabajo.

Algunos autores han sugerido que los caballos son huéspedes de mantenimiento y tienen la capacidad de eliminar las leptospiras en la orina durante largos periodos (2,6). Sin embargo, se encontró que el 3,25 % del personal ocupacionalmente expuesto en las remontas, tenía anticuerpos contra *Leptospira* spp. Esta baja frecuencia podría deberse a la prevención mediante barreras de protección personal al tener contacto con los fluidos de los caballos y a las medidas de bioseguridad, cuya inobservancia representa un riesgo de contraer la enfermedad (7).

En cuanto a la transmisibilidad, no se sabe si las condiciones de supervivencia de las leptospiras en el riñón de los caballos alteran la fisiología de la bacteria reduciendo su patogenicidad, o si hay diferencias de transmisibilidad entre machos y hembras, lo que no se comprobó dado que no se incluyeron yeguas en el estudio (13).

Cuadro 4. Análisis de regresión logística binaria de las variables evaluadas en la población humana positiva para *Leptospira* spp. en remontas de seis municipios colombianos

Variable	n	Títulos \geq 1:100 n (%)	p	OR	IC _{95%}
Edad (años)			0,008	1,1	0,1-1,2
3-7	18	8 (44,4)			
8-12	102	49 (48,0)			
\geq 13	33	22 (66,6)	+		
Frecuencia de salida			0,008	1,1	0,1-1,2
No sale	15	3 (20,0)			
1 vez por semana	18	6 (33,3)			
2 veces por semana	22	10 (45,4)			
3 veces por semana	42	27 (64,2)			
4 veces por semana	46	30 (65,2)			
5 veces por semana	10	3 (30,0)	+		
Temperatura			0,000	0,7	0,6-0,8
Baja (17 °C)	41	34 (83,0)			
Media (22 °C)	35	19 (54,2)			
Alta (24 °C)	77	26 (33,8)	+		
Almacenamiento de alimento concentrado			0,000	20,6	8,5-49,8
Malo	84	67 (79,7)			
Bueno	69	12 (17,4)	+		
Presencia de fauna silvestre			0,051	3,3	1,0-10,8
Sí	138	75 (54,3)	+		
No	15	4 (26,6)			

IC: intervalos de confianza, OR: razón de disparidad

+: Variables de las respuestas con un nivel de significación de 0,05 %

Cuadro 5. Análisis de regresión logística binaria de las variables asociadas con la serorreacción al serovar Djasiman en remontas de seis municipios colombianos

Variable	n	Títulos \geq 1:100 n (%)	p	OR	IC _{95%}
Frecuencia de salida			0,004	1,4	1,1-1,8
No sale	15	4 (26,7)			
1 vez por semana	18	6 (33,3)			
2 veces por semana	22	13 (59,1)			
3 veces por semana	42	29 (69,0)			
4 veces por semana	46	28 (60,1)			
5 veces por semana	10	7 (70,0)	+		
Temperatura			0,001	0,8	0,7-0,9
Baja (17 °C)	41	32 (78,0)			
Media (22 °C)	35	21 (60,0)			
Alta (24 °C)	77	34 (44,1)	+		
Almacenamiento de alimento concentrado			0,000	8,5	2,6-28,6
Malo	84	65 (77,3)	+		
Bueno	69	22 (31,9)			

IC: intervalos de confianza, OR: razón de disparidad

+: Variables de las respuestas con un nivel de significación de 0,05 %

La seroprevalencia contra *Leptospira* spp. en los caballos estudiados (85 %) es una de las más altas reportadas en el mundo. En Brasil, se han registrado las siguientes seroprevalencias: en São Paulo, 54 % (23), en Paraíba, 16,2 % (24), en Curitiba, 75,8 % (25), en Río de Janeiro, 47,8 % (8), y en Paraná, 66,8 % (26). En Suecia, se ha registrado 27 % (27), en Corea, 25 % (9), en Irán, 7,77 % (28), en Mongolia, 17,1 % (29), en Alemania, 17,2 % (30), en Portugal, 37 % (31), en Sudáfrica, 39,3 % (32), en Australia, 35 % (33), y en Etiopía, 44 % (4). En la Sabana de Bogotá, se ha registrado

una seroprevalencia de 40,4 % (34), en Santander, 66,7 % (35), y en la región del Meta y Guaviare, 76,6 % (17).

En este caso, la alta serorreacción frente a varios serovares podría representar infecciones concomitantes y estar asociada con la frecuencia en que los caballos estudiados salían de las instalaciones, ya que ello favorece el contacto directo con otros caballos, y animales domésticos y silvestres (5). Asimismo, las variadas condiciones de pastoreo y confinamiento de los caballos podrían haber incrementado su exposición a leptospiras diseminadas por roedores, animales silvestres y otros huéspedes de mantenimiento presentes en el suelo, los pastos y las fuentes de agua (3,7).

En este estudio, predominó la presentación subclínica de la leptospirosis: a pesar de que se registró una alta seroprevalencia, los caballos tenían una buena condición corporal y no presentaban los signos clínicos y los antecedentes característicos de la leptospirosis en los caballos adultos (2,6) manejados bajo condiciones de confinamiento (5,15). Asimismo, se encontraron títulos individuales de 1:800 o más en la MAT, hallazgo que, además de la presencia de animales asintomáticos, puede considerarse un indicativo de la presentación endémica de la leptospirosis en la población caballar evaluada (1). Teniendo en cuenta que los caballos del estudio pertenecen a la Policía Nacional, se recomienda el tratamiento antibiótico de los caballos positivos como medida de control de la infección, estrategia que se ha empleado en Croacia en todos los caballos utilizados para deporte y recreación (3).

Algunos mamíferos silvestres pueden actuar como huéspedes de mantenimiento de los serovares Djasiman y Shermani (22,36), aspecto que recientemente fue reportado en chigüiros (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de la región amazónica (37). El serovar Djasiman fue descrito por primera vez en Indonesia y en el sudeste asiático, donde se vinculó con leptospirosis en turistas (31), y también, se aisló de un feto canino abortado en Argentina (38). En este estudio, el serogrupo Djasiman fue el más frecuente en las remontas de Cali, Tuluá y Armenia, lo que coincide con reportes de Sudáfrica y Etiopía (4,32).

En cuanto al serogrupo Shermani, varios autores sugieren que tiene poca importancia en la epidemiología de la leptospirosis (25,28,30). No obstante, los caballos de las remontas en las cuales se reportó la presencia de especies silvestres, presentaron 3,3 veces más probabilidad de ser reactivos a este serogrupo en la prueba MAT. Este serogrupo también se asoció con un caso de leptospirosis humana que cursó con hemorragia intraalveolar, lo cual es indicativo de un cuadro clínico grave (31).

La alta seroprevalencia del serogrupo Shermani en los caballos de mayor edad de este estudio, sugiere su adaptación a estos animales y, tal vez, la persistencia de los títulos durante muchos años, por lo que existe la posibilidad de que los caballos sean huéspedes de mantenimiento de este serogrupo (26).

Algunos investigadores han reportado la presencia de leptospiuria crónica, inclusive, a lo largo de toda la vida en los caballos (8,14). Asimismo, con la inoculación experimental de caballos con *L. interrogans* serovar Kinnenwicki, se registró la presencia de leptospiemia (entre dos y seis días) y de leptospiuria (durante cuatro semanas) después de la infección, lo cual indica que dichos animales podían diseminar la bacteria (39). En el estudio se obtuvo el crecimiento de espiroquetas en el 65 % de los urocultivos, pero no se puede descartar su ausencia en las muestras negativas, porque la

excreción de la bacteria por la orina en los huéspedes de mantenimiento es, en ocasiones, intermitente (20). La gran proporción de urocultivos positivos (64,7 %) sugiere la persistencia de las bacterias en los túbulos renales y la potencial importancia en su diseminación (14). Sin embargo, es conveniente hacer estudios complementarios en la población general de caballos, sobre todo teniendo en cuenta que en el presente estudio la prueba de PCR fue negativa en todos los casos.

Los resultados divergen en cuanto al aislamiento de leptospiras de las muestras de caballos mediante la técnica de PCR. Algunos investigadores de Brasil obtuvieron resultados positivos en una PCR cuantitativa con el gen *SecY* (40,41) y, en una convencional, con el gen *LipL32* (8). Sin embargo, otros autores, también en Brasil, no lo lograron utilizando una PCR cuantitativa en caballos carretilleros (24), resultados que concuerdan con los del presente estudio y podrían relacionarse con fallas en el procedimiento de cultivo o de lectura (8), o con el hecho de que el muestreo no se hizo en la fase aguda de la infección (39), o porque se desconocían las rutas naturales de la infección en los caballos evaluados en este estudio (ya que, en una investigación previa, los animales infectados experimentalmente por vía subcutánea y ocular, no presentaron leptospiruria ni leptospiremia) (24), así como con la presencia de inhibidores de la PCR no detectados en la muestra (10).

En un estudio en Colombia, se amplificó el gen *LipL32* a partir de muestras de orina humana y de animales domésticos (cerdos y perros), así como de agua y macerado de riñón de roedores sinantrópicos, y los resultados sugirieron que se daba una transmisión de leptospiras entre los animales, el ambiente y los humanos en la región evaluada (42).

Todavía no se ha verificado la idoneidad de los mecanismos celulares y moleculares para establecer la patogenicidad de las leptospiras (8). La proteína LipL32 representa hasta el 75 % de la membrana externa de las leptospiras patógenas y su estudio ha sido relevante, dada su localización, su conservación y su importancia en la reacción inmunitaria de la bacteria, y porque está ausente en las leptospiras saprofitas (43).

El hecho de que no se detectara el ADN de los cultivos de espiroquetas en el presente trabajo, podría relacionarse con la presencia de leptospiras saprofitas. No obstante, la PCR de control de la extracción reveló que las muestras tenían ADN bacteriano, por lo que también es posible que la cantidad de leptospiras patógenas presentes en la orina fuera inferior a 100.000 bacterias/ml, cantidad necesaria para su detección con la prueba de PCR convencional (10). Además, según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), el que no se detecte la presencia de leptospiras en la orina de un animal no es suficiente para descartar la posibilidad de que sea portador renal crónico y solo indica que el caballo no excretaba cantidades detectables de leptospiras en el momento del examen (21).

En futuros estudios, lo ideal sería usar una PCR cuantitativa o técnicas diagnósticas que permitan la identificación completa de cepas de leptospira para establecer si son patógenas o saprofitas, así como la especie de *Leptospira* a la que pertenece la cepa y su serogrupo o serotipo. Entre dichas pruebas, se cuentan las de virulencia, de resistencia relativa a la 8-azaguanina, de actividad de la lipasa, de tolerancia a la sal, así como las de temperatura y contenido de G+C en el ADN (21), aspecto que no fue objeto de esta investigación.

Se puede concluir que la baja seroprevalencia de leptospirosis en el personal ocupacionalmente expuesto aquí analizado, podría asociarse con la implementación de medidas de prevención y el uso de elementos de protección personal.

Por otra parte, la alta seroprevalencia contra leptospiras en los caballos pone en evidencia la exposición natural a las bacterias, puesto que ningún animal había sido vacunado. Asimismo, los altos títulos hallados, el crecimiento de espiroquetas en el urocultivo y la presentación subclínica de la infección, indican un comportamiento endémico de la leptospirosis en la población evaluada. Los hallazgos sugieren que los caballos pueden comportarse como reservorios de las leptospiras, pero la dinámica de su mantenimiento, de su colonización persistente de los túbulos renales y de la subsiguiente eliminación de la bacteria por la orina, aún se desconoce, por lo que es necesario hacer estudios sistemáticos de detección de anticuerpos contra *Leptospira* spp. para establecer la exposición, la permanencia de títulos, la dinámica de los niveles de anticuerpos y los serogrupos infecciosos, entre otros aspectos.

Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigaciones y Posgrados de la Universidad de Caldas, a la Universidad del Valle, al Proyecto de Formación de Talento Humano de Alto Nivel del Tolima y a la Policía Nacional por la financiación de la investigación.

Referencias

1. Levett PN. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? Clin Appl Immunol Rev. 2004;4:435-48. <https://doi.org/10.1016/j.cair.2004.08.001>
2. Verma A, Stevenson B, Adler B. Leptospirosis in horse. Vet Microbiol. 2013;167:61-6. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.012>
3. Habus J, Persic Z, Spicic S, Vince S, Zrinka S, Milas Z, *et al.* New trends in human and animal leptospirosis in Croatia, 2009-2014. Acta Tropica. 2017;168:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.01.002>
4. Tsegay K, Potts AD, Aklilu N, Lötter C, Gummow B. Circulating serovars of *Leptospira* in cart horses of central and southern Ethiopia and associated risk factors. Prev Vet Med. 2016;125:106-15. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.01.009>
5. Tadich TA, Tapia C, González D. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in working horses located in the Central Region of Chile. J Equine Vet Sci. 2016;38:14-8. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.12.011>
6. Hamond C, Martins G, Lilenbaum W. Subclinical leptospirosis may impair athletic performance in racing horses. Trop Anim Health Prod. 2012;44:1927-30. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0158-5>
7. Mwachui MA, Crump L, Hartskeerl R, Zinsstag J, Hattendorf J. Environmental and behavioural determinants of leptospirosis transmission: A systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9:1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003843>
8. Hamond C, Martins G, Lawson-Ferreira R, Medeiros MA, Lilenbaum W. The role of horses in the transmission of leptospirosis in an urban tropical area. Epidemiol Infect. 2013;141:33-5. <https://doi.org/10.1017/S0950268812000416>
9. Jung BY, Lee KW, Ha TY. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in clinically healthy racing horses in Korea. J Vet Med Sci. 2010;72:197-201. <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0273>
10. Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;78:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.012>
11. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospirae by real-time quantitative PCR. J Med Microbiol. 2005;54:45-9. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45860-0>

12. Kositanont U, Rugsasuk S, Leelaporn A, Phulsuksombati D, Tantiwanawat S, Naigowit P. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;57:117-22. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.07.014>
13. Hamond C, Martins G, Lilenbaum W, Madeiros MA. PCR detection of leptospiral carriers among seronegative horses. *Vet Rec.* 2012;171:105-6. <https://doi.org/10.1136/vr.e5022>
14. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol.* 2001;14:296-326. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
15. Agudelo-Flórez P, Restrepo-Jaramillo BN, Arboleda-Naranjo M. Situación de la leptospirosis en el Urabá antioqueño colombiano: estudio seroepidemiológico y factores de riesgo en población general urbana. *Cad Saúde Pública.* 2007;23:2094-102. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2007000900017>
16. Romero MH, Sánchez J, Hayek LC. Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en población urbana humana y canina del departamento del Tolima. *Rev Salud Pública.* 2010;12:268-75. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642010000200010>
17. Rey-Riaño LA, Pineda-Rojas NF, Góngora-Orjuela A, Parra-Arango JL, Patiño-Burbano RE. Evaluación serológica a *Leptospira* spp. en equinos aparentemente sanos en municipios del Meta y Guaviare, Colombia. *Revista Lasallista de Investigación* 2015;12:154-61.
18. Troncoso-Toro I, Toro-Barros J, Guzmán-Cáceres A, Fuentealba-Ortega J, Wiethuchter CF. Evaluación serológica de *Leptospira interrogans* en equinos pertenecientes um centro equestre da província de Linares, Chile. *Revista CES de Medicina y Zootecnia* 2013;8:101-7.
19. Scheaffer RL, Mendenhall W, Ott L. Elementos de muestreo. Madrid: Editorial Paraninfo, S.A.; 2006. p. 51
20. Astudillo-Hernández M, González-Rodríguez A, Batista-Santiesteban N, Mirabal-Sosa M, Menéndez-Hernández J. Estudio seroepidemiológico de la leptospirosis humana en el departamento del Valle del Cauca, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2009;61:1-10.
21. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). Quinta edición. París: OIE; 2004. p. 1260. <http://www.oie.int/doc/ged/d6508.pdf>
22. Moreno N, Flórez PA. Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de *Leptospira* spp. en Colombia. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2010;27:548-56.
23. Langoni H, Da Silva A, Pezerico S, De Lima V. Anti-leptospire agglutinins in equine sera, from São Paulo, Goiás, and Mato Grosso do sul, Brazil, 1996-2001. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2004;10:207-18. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992004000300003>
24. de Oliveira-Filho RB, Malta KC, Oliveira JM, Assis-Santana VL, Harrop MHV, Stipp DT, *et al.* Epidemiological analysis of *Leptospira* spp. infection in equids from the Brejo Paraibano microregion in Brazil. *J Equine Vet Sci.* 2014;34:407-14. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.08.001>
25. Finger MA, Barros Filho IR, Leutenegger C, Estrada M, Ullmann LS, Langoni H, *et al.* Serological and molecular survey of *Leptospira* spp. among cart horses from an endemic area of human leptospirosis in Curitiba, southern Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2014;56:473-6. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000600003>
26. Hashimoto VY, Gonçalves DD, da Silva FG, de Oliveira RC, Alves LA, Reichmann P, *et al.* Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp. in horses of the urban area of Londrina, Paraná, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2007;49:327-30. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652007000500010>
27. Båverud V, Gunnarsson A, Engvall EO, Franzén P, Egenvall A. Leptospira seroprevalence and associations between seropositivity, clinical disease and host factors in horses. *Acta Vet Scand.* 2009;51:1-10. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-51-15>
28. Khoushah Y, Hassanpour A, Abdollahpour GR, Mogaddam S. Seroprevalence of leptospira infection in horses in ardabil-iran. *Glob Vet.* 2012;9:586-9. [http://idosi.org/gv/GV9\(5\)12/14.pdf](http://idosi.org/gv/GV9(5)12/14.pdf)
29. Odontsetseg N, Boldbaatar D, Mweene AS, Kida H. Serological prevalence of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava in horses in Mongolia. *Vet Rec.* 2005;157:518-9. <https://doi.org/10.1136/vr.157.17.518>

30. Pikalo J, Sattler T, Eichinger M, Loitsch A, Sun H, Schmoll F, *et al.* Occurrence of antibodies against *Leptospira* in horses in Middle Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2016;129:202-8.
31. Rocha T, Ellis WA, Montgomery J, Gilmore C, Regalla J, Brem S. Microbiological and serological study of leptospirosis in horses at slaughter: First isolations. *Res Vet Sci.* 2004;76:199-202. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2003.12.003>
32. Simbizi V, Saulez MN, Potts A, Letter C, Gummow B. A study of leptospirosis in South African horses and associated risk factors. *Prev Vet Med.* 2016;134:6-15. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.09>
33. Wangdi C, Picard J, Tan R, Condon F, Dowling B, Gummow B. Equine leptospirosis in tropical Northern Queensland. *Aust Vet J.* 2013;91:190-7. <https://doi.org/10.1111/avj.12038>
34. Valencia C, Silva J. Prevalencia de *Leptospira* spp. en equinos en la sabana de Bogotá (tesis). Bogotá: Universidad de la Salle; 2007.
35. Bedoya-Ríos MA, Jaimes-Salcedo J, Molina-Sanguino LM. Prevalencia de *Leptospira* spp. en equinos de la vereda Guatiguara del municipio de Piedecuesta, Santander. *Rev Electron Vet.* 2013;14:1-6.
36. Vieira AS, Narduche L, Martins G, Schabib Péres IA, Zimmermann NP, Juliano RS, *et al.* Detection of wild animals as carriers of *Leptospira* by PCR in the Pantanal biome, Brazil. *Acta Trop.* 2016;163:87-9. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.08.001>
37. de Albuquerque NF, Martins G, Medeiros L, Lilenbaum W, Ribeiro VM. The role of capybaras as carriers of leptospires in periurban and rural areas in the western Amazon. *Acta Trop.* 2017;169:57-61. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.01.018>
38. Rossetti CA, Liem M, Samartino LE, Hartskeerl RA. Buenos Aires, a new *Leptospira* serovar of serogroup Djasiman, isolated from an aborted dog fetus in Argentina. *Vet Microbiol.* 2005;107:241-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.015>
39. Yan W, Faisal SM, Divers T, McDonough SP, Akey B, Chang YF. Experimental *Leptospira interrogans* serovar Kinnewicki infection of horses. *J Vet Intern Med.* 2010; 24:912-7. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0507.x>
40. Hamond C, Pestana CP, Rocha-de-Souza CM, Cunha LE, Brandao FZ, Medeiros MA, *et al.* Presence of leptospires on genital tract of mares with reproductive problems. *Vet Microbiol.* 2015;179:264-9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.06.014>
41. Hamond C, Martins G, Bremont S, Medeiros MA, Bourhy P, Lilenbaum W. Molecular characterization and serology of *Leptospira kirschneri* (Serogroup Grippotyphosa) isolated from urine of a mare post-abortion in Brazil. *Zoonoses Public Health.* 2016;63:191-5. <https://doi.org/10.1111/zph.12224>
42. Calderón A, Rodríguez V, Máttar S, Arrieta G. Leptospirosis in pigs, dogs, rodents, humans, and water in an area of the Colombian tropics. *Trop Anim Health Prod.* 2014;46:427-32. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0508-y>
43. Murray GL, Srikrum A, Hoke DE, Wunder EA, Henry R, Lo M, *et al.* Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* 2009;77:952-8. <https://doi.org/10.1128/IAI.01370-08>

Artículo original

Costos médicos directos de las infecciones del tracto urinario por bacilos Gram negativos resistentes a betalactámicos en un hospital de alta complejidad de Medellín, Colombia

Carlos Andrés Vargas-Alzate¹, Luis Felipe Higueta-Gutiérrez^{1,2,3}, Judy Natalia Jiménez-Quiceno¹

¹ Línea de Epidemiología Molecular Bacteriana, Grupo de Microbiología Básica y Aplicada, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Grupo de Investigación en Salud y Sostenibilidad, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

³ Grupo de Investigación INFETTARE, Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia, Medellín, Colombia

Institución donde se llevó a cabo el estudio:

Línea de Epidemiología Molecular Bacteriana, Grupo de Microbiología Molecular, Grupo de Investigación en Microbiología Básica y Aplicada (MICROBA), Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. Las infecciones del tracto urinario son muy frecuentes en el ámbito hospitalario. Debido a la aparición de la resistencia antimicrobiana, la complejidad de los procesos de atención ha aumentado y, con ello, la demanda de recursos.

Objetivo. Describir y comparar el exceso de los costos médicos directos de las infecciones del tracto urinario por *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a betalactámicos.

Materiales y métodos. Se llevó a cabo un estudio de cohorte en una institución de tercer nivel de Medellín, Colombia, entre octubre del 2014 y septiembre del 2015. Se incluyeron los pacientes con infección urinaria, unos por bacterias sensibles a los antibióticos betalactámicos, y otros por bacterias resistentes a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y a los antibióticos carbapenémicos. Los costos se analizaron desde la perspectiva del sistema de salud. La información clínico-epidemiológica se obtuvo de las historias clínicas y los costos se calcularon utilizando los manuales tarifarios estándar. El exceso de costos se estimó mediante análisis multivariados.

Resultados. Se incluyeron 141 pacientes con infección urinaria: 55 (39 %) por bacterias sensibles a los betalactámicos, 54 (38,3 %) por bacterias resistentes a las cefalosporinas y 32 (22,7 %) por bacterias resistentes a los carbapenémicos. El exceso de costos totales ajustado de los 86 pacientes con infecciones del tracto urinario por bacterias resistentes a las cefalosporinas y a los carbapenémicos, fue de USD\$ 193 (IC_{95%} -347 a 734) y USD\$ 633 (IC_{95%} -50 a 1.316), respectivamente comparados con el grupo de 55 pacientes por bacterias sensibles a los betalactámicos. Las diferencias se presentaron principalmente en el uso de antibióticos de amplio espectro, como el meropenem, la colistina y la fosfomicina.

Conclusión. Los resultados evidenciaron un incremento sustancial de los costos médicos directos de los pacientes con infecciones del tracto urinario por bacterias resistentes a las cefalosporinas o a los carbapenémicos. Esta situación genera especial preocupación en los países endémicos como Colombia, donde la alta frecuencia de infecciones del tracto urinario y de resistencia a los betalactámicos puede causar un mayor impacto económico en el sector de la salud.

Palabras claves: betalactámicos; resistencia bacteriana; costos de la atención en salud; Gram-negativos; infecciones del tracto urinario.

Direct medical costs of urinary tract infections by Gram-negative bacilli resistant to beta-lactams in a tertiary care hospital in Medellín, Colombia

Introduction: Urinary tract infections are very frequent in the hospital environment and given the emergence of antimicrobial resistance, they have made care processes more complex and have placed additional pressure on available healthcare resources.

Objective: To describe and compare excess direct medical costs of urinary tract infections due to *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* resistant to beta-lactams.

Materials and methods: A cohort study was conducted in a third level hospital in Medellín, Colombia, from October, 2014, to September, 2015. It included patients with urinary

Recibido: 02/04/18

Aceptado: 18/06/18

Publicado: 18/06/18

Citación:

Vargas-Alzate C, Higueta-Gutiérrez L, Jiménez-Quiceno JN. Costos médicos directos de las infecciones del tracto urinario por bacilos Gram negativos resistentes a betalactámicos en un hospital de alta complejidad de Medellín, Colombia. Biomédica. 2019;39(Supl.1):35-49
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i1.3981>

Correspondencia:

Judy Natalia Jiménez-Quiceno, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Calle 67 N° 53-108, bloque 5, oficina 5-135, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 219 5497
jnatalia.jimenez@udea.edu.co

Contribución de los autores:

Carlos Andrés Vargas-Alzate y Luis Felipe Higueta-Gutiérrez: revisión de las historias clínicas y de los manuales tarifarios
Todos los autores participaron en el diseño metodológico, en el análisis de los datos y en la escritura del manuscrito.

Financiación:

Esta investigación fue financiada por la Estrategia para la Sostenibilidad para Grupos de Investigación, 2018-2019, del Comité para el Desarrollo de la Investigación de la Universidad de Antioquia.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

tract infections caused by beta-lactam-susceptible bacteria, third and fourth generation cephalosporin-resistant, as well as carbapenem-resistant. Costs were analyzed from the perspective of the health system. Clinical-epidemiological information was obtained from medical records and the costs were calculated using standard tariff manuals. Excess costs were estimated with multivariate analyses.

Results: We included 141 patients: 55 (39%) were sensitive to beta-lactams, 54 (38.3%) were resistant to cephalosporins and 32 (22.7%) to carbapenems. The excess total adjusted costs of patients with urinary tract infections due to cephalosporin- and carbapenem-resistant bacteria were US\$ 193 (95% confidence interval (CI): US\$ -347-734) and US\$ 633 (95% CI: US\$ -50-1316), respectively, compared to the group of patients with beta-lactam sensitive urinary tract infections. The differences were mainly found in the use of broad-spectrum antibiotics such as meropenem, colistin, and fosfomicin.

Conclusion: Our results show a substantial increase in the direct medical costs of patients with urinary tract infections caused by beta-lactam-resistant Gram-negative bacilli (cephalosporins and carbapenems). This situation is of particular concern in endemic countries such as Colombia, where the high frequencies of urinary tract infections and the resistance to beta-lactam antibiotics can generate a greater economic impact on the health sector.

Keywords: Beta-lactams; bacterial resistance; health care costs; Gram-negative; urinary tract infections.

Después de las infecciones respiratorias, las urinarias son las más frecuentes en el ámbito hospitalario y en la comunidad, lo que motiva cerca de siete millones de consultas médicas ambulatorias y 100.000 hospitalizaciones anuales (1-3). Dichas infecciones se han asociado, principalmente, con el uso de dispositivos invasivos como los catéteres urinarios, así como con complicaciones como la bacteriemia y la septicemia (4,5).

Entre los agentes etiológicos de las infecciones del tracto urinario, los bacilos Gram negativos resistentes a los betalactámicos constituyen un grave problema de salud pública por su alta frecuencia, y por su impacto clínico en términos de una mayor morbilidad y de prolongadas hospitalizaciones, además de la carga económica que implica su atención (6,7).

A nivel mundial, se reporta con mucha frecuencia la presencia de bacterias resistentes a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación: entre 20,8 y 26 % en Europa (8,9) entre 20,2 y 25,5 % en África (6,10) y hasta de 32,6 % en Latinoamérica (11). Por otra parte, en la última década, el uso intensivo de los carbapenémicos—considerados como la última opción terapéutica segura para el tratamiento de infecciones multirresistentes—ha generado la aparición y la diseminación de la resistencia a esta familia de antibióticos en todo el mundo, con frecuencias hasta de 19 % en Estados Unidos (12) y de 22 % en Europa (7,13,14).

Tradicionalmente, se ha considerado que la atención hospitalaria de las infecciones del tracto urinario tiene un bajo costo, pero su alta frecuencia y el aumento de la prevalencia de bacterias resistentes a los betalactámicos, han acrecentado su impacto financiero en el sector salud. En los Estados Unidos, se ha estimado que los costos médicos anuales (atención ambulatoria, medicamentos y gastos de hospitalización) de estas infecciones pueden llegar a ser de USD\$ 474 millones, otros costos no médicos (transporte, días de enfermedad y morbilidad), hasta de USD\$ 185 millones, y los costos indirectos (pérdida de producción laboral), de USD\$ 936 millones (15,16).

En Medellín, la segunda ciudad más importante de Colombia, se presenta una situación compleja en torno a la resistencia a los betalactámicos, ya que se han observado altos porcentajes de resistencia a las cefalosporinas en los últimos años, en las unidades de cuidados intensivos (19,4 %), así como en otros servicios hospitalarios (27,9 %) y en la atención ambulatoria (15 %)

(17). Asimismo, en las unidades de cuidados intensivos, es muy frecuente la resistencia a los carbapenémicos, como imipenem en *Klebsiella pneumoniae* (5,7 %) y en *Pseudomonas aeruginosa* (22,3 %), además de resistencia a meropenem (16,1 %) en *Acinetobacter baumannii* y a ertapenem (16,5 %) en *Enterobacter cloacae* (17).

Esta situación es preocupante, dado que en los estudios realizados previamente en la ciudad, las infecciones del tracto urinario han sido las más frecuentemente causadas por bacilos Gram negativos resistentes a los betalactámicos (18-20). A pesar de ello, no hay estudios locales que describan la carga económica que tal situación genera en el sector de la salud, y que respalden la adopción de decisiones sobre el uso de antibióticos y otras intervenciones en estos pacientes.

En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue describir y comparar el exceso de los costos médicos directos de las infecciones del tracto urinario por *K. pneumoniae*, *E. cloacae* y *P. aeruginosa* resistentes a los betalactámicos en un hospital de alto nivel de complejidad de Medellín.

Materiales y métodos

Diseño y población de estudio

Se llevó a cabo un estudio de cohorte entre el 1° de octubre de 2014 y el 30 de septiembre de 2015, en una institución de Medellín de alto nivel de complejidad con una capacidad de 754 camas. Se incluyeron todos los pacientes mayores de 18 años hospitalizados en los diferentes pabellones con diagnóstico de infección del tracto urinario por *K. pneumoniae*, *E. cloacae* o *P. aeruginosa*. No se excluyó a ningún paciente del estudio.

Identificación y sensibilidad de los aislamientos bacterianos

La identificación y la sensibilidad de los aislamientos se establecieron empleando el sistema VITEK 2™ (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Los controles de calidad y la interpretación de la sensibilidad se determinaron según las normas establecidas por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2015 (21).

Grupos de comparación

A partir de la sensibilidad de los aislamientos, se conformaron tres grupos de comparación, como se explica a continuación.

Sensibles a betalactámicos (grupo no expuesto). Pacientes infectados por *K. pneumoniae*, *E. cloacae* o *P. aeruginosa* sensibles a los betalactámicos (cefalosporinas de tercera o cuarta generación y carbapenémicos).

Resistentes a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (grupo expuesto 1). Pacientes infectados por *K. pneumoniae*, *E. cloacae* o *P. aeruginosa* resistentes, por lo menos, a una cefalosporina de tercera o cuarta generación.

Resistentes a carbapenémicos (grupo expuesto 2). Pacientes infectados por *K. pneumoniae*, *E. cloacae* o *P. aeruginosa* resistentes, por lo menos, a un carbapenémico (*K. pneumoniae* y *E. cloacae*: a ertapenem, imipenem, meropenem y doripenem; *P. aeruginosa*: a imipenem, meropenem y doripenem).

El exceso de costos debido a la resistencia se definió como el costo 'incremental' (sic) de un paciente con infección urinaria por bacterias resistentes

a cefalosporinas de tercera y cuarta generación o a carbapenémicos, frente a los costos de un paciente con infección urinaria por bacterias sensibles (22).

Recolección de la información clínico-epidemiológica

La información clínico-epidemiológica de cada paciente se obtuvo a partir de la revisión de las historias clínicas. Se incluyeron las características sociodemográficas, la descripción de la infección, las comorbilidades, la hospitalización y la evolución del paciente una vez finalizado el tratamiento antibiótico. Para medir la gravedad de las comorbilidades, se utilizó el índice de Charlson (23), en tanto que la clasificación de las infecciones asociadas a la atención en salud o adquiridas en la comunidad se ajustó a las definiciones de los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (24).

Estimación de los costos médicos directos

Las variables incluidas en la estimación de los costos directos se seleccionaron según los rubros considerados en estudios previos similares a este (25-28). Se conformó un panel integrado por un médico infectólogo, un epidemiólogo, un experto en resistencia bacteriana y un gerente de sistemas de información en salud. Además, se diseñó un formulario que incluyó todos los rubros correspondientes a costos totales, estancia hospitalaria, medicamentos (especificando la contribución de los antibióticos), pruebas de laboratorio, tratamiento antibiótico ambulatorio, procedimientos quirúrgicos, interconsultas e imágenes diagnósticas, y se estableció el costo de cada uno de ellos.

Se calcularon los costos día a día a partir del momento del diagnóstico clínico y hasta finalizado el tratamiento antibiótico desde la perspectiva del Sistema General de Seguridad Social en Salud de Colombia. El costo de los medicamentos se estableció con base en el reporte de los precios del 2014 en el sistema de medicamentos del Ministerio de Salud, en tanto que el costo de los procedimientos quirúrgicos, interconsultas, exámenes de laboratorio, imágenes diagnósticas y estancia hospitalaria, se tomó del manual tarifario del Instituto de Seguros Sociales (Acuerdo No. 256 de 2001), con un incremento del 30 % según la recomendación del Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud (29).

El costo total de los medicamentos se obtuvo multiplicando el número de dosis suministradas al paciente por el costo unitario del medicamento registrado en el manual de medicamentos. El costo total de los procedimientos se calculó multiplicando el precio del procedimiento según el manual de procedimientos por el número de veces que este se aplicó al paciente. En cuanto a los procedimientos quirúrgicos, el costo se calculó sumando los honorarios médicos del cirujano, del anesthesiólogo, del ayudante quirúrgico, de los derechos de sala y de los materiales.

Los costos se determinaron en pesos colombianos y luego se convirtieron a dólares estadounidenses, teniendo en cuenta el promedio de la tasa de cambio del 2014 publicada por el Banco de la República de Colombia (30).

Análisis estadístico

Se utilizaron frecuencias absolutas y relativas en las variables cualitativas. Se determinó el cumplimiento del supuesto de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk y se calcularon las medianas con el rango intercuartílico en las variables cuantitativas.

La diferencia entre las variables categóricas se determinó a partir de la prueba de ji al cuadrado de Pearson y, para las cuantitativas, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y, posteriormente, una prueba U de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni, para conocer entre cuáles categorías se presentaban diferencias significativas (31).

Para los análisis bivariado y multivariado, se emplearon modelos lineales generalizados con distribución gamma y función de enlace de identidad para cada una de las variables costeadas ($\beta=0,75$; $\alpha=1,33$). En el análisis multivariado, se tomó como resultado, o desenlace, el exceso de costos, el cual se ajustó por las variables que pudieran afectar la diferencia de los costos, como los días de hospitalización antes del diagnóstico de la infección, la bacteria aislada, las comorbilidades presentes en el momento del ingreso del paciente y la muerte durante la hospitalización, establecidas en el análisis bivariado, así como en estudios previos. Se consideraron significativos los valores de p menores de 0,05 y todos los datos se procesaron en el programa Stata™, versión 12.

Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética para la Investigación en Humanos de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia (Acta 14-35-572). Se obtuvo, además, la aprobación del comité de ética del hospital participante.

Resultados

Se registraron 141 pacientes con infección del tracto urinario durante el periodo de estudio, de los cuales: 39 (27,7 %) habían tenido infecciones asociadas con la sonda vesical; 55 (39 %) habían presentado infecciones por bacterias sensibles a los betalactámicos; 54 (38,3 %) habían tenido infecciones por bacterias resistentes a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y 32 (22,7%) habían contraído infecciones por bacterias resistentes a los carbapenémicos (cuadro 1).

La mayoría de los pacientes eran hombres (69,1 % de los sensibles a betalactámicos, 63,0 % de los resistentes a cefalosporinas y 84,4 % de los resistentes a carbapenémicos). La mediana de edad fue similar: 72 años (rango intercuartílico, RIC=56-81); 70,5 años (RIC=51-80) y 70 años (RIC=58-79), respectivamente.

Las principales especialidades tratantes fueron Medicina Interna (54,5 %, 46,3 % y 40,6 %, respectivamente) y Urología (21,8 %, 24,1 % y 31,3 %, respectivamente). El índice de Charlson fue similar en los tres grupos: 4 (RIC=3-6), 4,5 (RIC=3-6) y 4 (RIC=2,5-5,5) respectivamente. Las comorbilidades más frecuentes fueron diabetes (32,7 %, 27,8 % y 18,8 %, respectivamente) y enfermedad pulmonar (21,8 %, 25,9 % y 21,9 %, respectivamente).

En todos los grupos prevalecieron las infecciones adquiridas en la comunidad (70,9 %, 75,9 % y 59,4 %, respectivamente) y *K. pneumoniae* fue la bacteria que se aisló con mayor frecuencia (63,6 %, 94,4 % y 53,1 %, respectivamente).

En el grupo con bacterias sensibles a los betalactámicos y en aquel con resistencia a los carbapenémicos, fue más frecuente la necesidad de mantener la hospitalización al finalizar el tratamiento antibiótico (47,3 % y 46,9 %, respectivamente), en tanto que en el grupo con resistencia a las cefalosporinas predominó la hospitalización en casa (40,7 %). La mediana de

días de estancia hospitalaria fue similar en los tres grupos: 8 (RIC=5-11), 10 (RIC=7-12) y 10 (RIC=6,5-14), respectivamente.

No se encontraron diferencias significativas en las variables que podían determinar una diferencia en los costos entre los grupos, tales como la hospitalización previa a la infección y las comorbilidades (cuadro 1).

Descripción de los costos según los grupos de pacientes

La mediana de los costos totales de hospitalización en el grupo de pacientes infecciones del tracto urinario resistentes a las cefalosporinas, fue de USD\$ 1.236 (RIC=909-1.854) y, en el de resistentes a los carbapenémicos fue de USD\$ 1.473 (RIC: 916-2.944), en tanto que, en el grupo de sensibles a betalactámicos fue de USD\$ 892 (RIC=601-1.577).

Cuadro 1. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes con infecciones del tracto urinario por bacterias sensibles a los betalactámicos, resistentes a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y a los carbapenémicos

Variable	No expuestos ITU sensibles a betalactámicos (n=55)	Expuesto 1 ITU resistentes a cefalosporinas (n=54)	Expuesto 2 ITU resistentes a carbapenémicos (n=32)	P
Edad [mediana (RIC)]	72 (56,0-81,0)	70,5 (51-80)	70 (58-79)	0,841 [†]
Sexo, hombre [n (%)]	38 (69,1)	34 (63,0)	27 (84,4)	0,108*
Días transcurridos entre el ingreso al hospital y el diagnóstico clínico [mediana (RIC)]	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-6)	0,067 [†]
Especialidad tratante [n (%)]				
Medicina interna	30 (54,5)	25 (46,3)	13 (40,6)	0,486*
Urología	12 (21,8)	13 (24,1)	10 (31,3)	
Nefrología	7 (12,7)	11 (20,4)	4 (12,5)	
Cirugía	3 (5,5)	3 (5,6)	2 (6,3)	
Índice de Charlson [mediana (RIC) ^a]	4 (3-6)	4,5 (3-6)	4 (2,5-5,5)	0,831 [†]
Infección asociada a la atención en salud [n (%)]	16 (29,1)	13 (24,1)	13 (40,6)	0,265*
Bacteria aislada [n (%)]				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	35 (63,6)	51 (94,4)	17 (53,1)	<0,001*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11 (20,0)	3 (5,6)	6 (18,8)	
<i>Enterobacter cloacae</i>	9 (16,4)	-	9 (28,1)	
ITU asociada con uso de sonda vesical [n (%)]	11 (20,0)	14 (25,9)	14 (43,8)	0,054*
Evolución [n (%)]				
Continuó hospitalizado ^b	26 (47,3)	16 (29,6)	15 (46,9)	<0,001*
Hospitalización en casa ^c	5 (9,1)	22 (40,7)	7 (21,9)	
Mejoría ^d	18 (32,7)	6 (11,1)	3 (9,4)	
Muerte	2 (3,6)	0	3 (9,4)	
Días transcurridos entre la fecha del diagnóstico clínico y la finalización del tratamiento antibiótico [mediana (RIC)]	8 (5-11)	10 (7-12)	10 (6,5-14)	0,159 [†]

ITU: infecciones del tracto urinario; RIC: rango intercuartílico

En negrilla, p<0,05

* Prueba de ji al cuadrado de Pearson

[†] Prueba de Kruskal-Wallis

^a Índice de comorbilidades para enfermedades crónicas que pueden alterar a corto plazo el riesgo de morir del paciente y que se presentan durante toda la hospitalización. Los puntajes de las enfermedades se encuentran entre 1 y 6, y después de los 50 años el índice se incrementa en un punto por cada década. Cuanto más alto el puntaje, mayor es la gravedad de las comorbilidades.

^b El paciente finalizó el tratamiento antibiótico y siguió hospitalizado.

^c Por su situación clínica, el paciente fue atendido con tratamiento antibiótico intravenoso en su lugar de residencia con los elementos y por el personal requerido para una adecuada recuperación.

^d El paciente se recuperó parcialmente de la infección y continuó tomando antibióticos por vía oral después de ser dado de alta.

Con respecto al grupo de infecciones sensibles a los betalactámicos, los antibióticos representaron la mayor diferencia en la mediana de los costos: en el grupo con resistencia a las cefalosporinas dicha mediana fue de USD\$ 103 ($p < 0,001$) y, en aquel con resistencia a los carbapenémicos fue de USD\$ 102 ($p < 0,001$) (cuadro 2). Estos resultados siguieron siendo significativos tras aplicar la corrección de Bonferroni.

Cuadro 2. Descripción de los costos de atención hospitalaria de los pacientes con infección del tracto urinario por bacterias sensibles a los betalactámicos, resistentes a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y a los carbapenémicos

Costos	No expuestos ITU sensibles a betalactámicos (n=55)		Expuestos 1 ITU resistentes a cefalosporinas (n=54)		Expuestos 2 ITU resistentes a carbapenémicos (n=32)		p
	Mediana, USD	(RIC)	Mediana, USD	(RIC)	Mediana, USD	(RIC)	
Total atención hospitalaria	892	(601 - 1.577)	1.236	(909 - 1.854)	1.473	(916 - 2.944)	0,018^{††}
Antibióticos	20	(12 - 66)	123	(60 - 203)	122	(49 - 881)	<0,001^{††}
Otros medicamentos	90	(37 - 229)	105	(76 - 229)	131	(69 - 190)	0,259*
Antibióticos después de la hospitalización	0,917	(0,655 - 3)	78	(3 - 133)	102	(13 - 202)	<0,001^{††}
Interconsultas	43	(22 - 65)	43	(22 - 65)	43	(22 - 76)	0,481*
Exámenes de laboratorio	206	(141 - 322)	189	(109 - 353)	205	(178 - 283)	0,722*
Imágenes diagnósticas	92	(39 - 212)	71	(33 - 177)	103	(23 - 269)	0,716*
Otros procedimientos	62	(17 - 73)	62	(6 - 99)	62	(6 - 81)	0,925*
Estancia hospitalaria (habitación)	399	(228 - 761)	513	(342 - 733)	518	(309 - 842)	0,283*

ITU: infecciones del tracto urinario; RIC: rango intercuartílico

En negrilla: $p < 0,05$

* Prueba de Kruskal-Wallis

† Prueba de Kruskal-Wallis con corrección de Bonferroni

Exceso de costos de los pacientes con infecciones del tracto urinario por bacterias resistentes a las cefalosporinas o a los carbapenémicos

El exceso de costos, crudo y ajustado, de los pacientes con infecciones del tracto urinario por bacterias resistentes a las cefalosporinas o a los carbapenémicos, se presenta en el cuadro 3.

En el análisis bivariado, el mayor exceso de costos correspondió a los antibióticos administrados durante la hospitalización. Después de ajustar los costos por los días de hospitalización antes del diagnóstico de la infección, la bacteria aislada, el índice de Charlson y la muerte durante la hospitalización, el exceso de los costos totales de la atención hospitalaria en el grupo con resistencia a las cefalosporinas fue de USD\$ 193 (IC_{95%} -347 a 734) y, en aquel con resistencia a los carbapenémicos, fue de USD\$ 633 (IC_{95%} -50 a 1.316).

El principal exceso de costos en los dos grupos con resistencia a los betalactámicos, correspondió al de los antibióticos administrados durante la hospitalización. En aquel con resistencia a las cefalosporinas, el exceso ajustado fue de USD\$ 97 (IC_{95%} 41-154) y solo un paciente recibió tratamiento combinado. En el grupo con resistencia a los carbapenémicos, el exceso de costos fue de USD\$ 509 (IC_{95%} 250-768), en el cual, el 59,4 % de los pacientes recibieron tratamientos combinados con meropenem, polimixina, fosfomicina y colistina. Los costos de los antibióticos por día fueron superiores en el grupo con resistencia a los betalactámicos, en los cuales las mayores diferencias se presentaron entre los días 3 y 10 después del diagnóstico clínico (figura 1).

Cuadro 3. Exceso de costos de la atención hospitalaria de los pacientes con infecciones del tracto urinario por bacterias resistentes a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y a los carbapenémicos

Costos	Expuesto 1				Expuesto 2			
	Exceso de costos crudo por ITU resistente a cefalosporinas (coeficiente, IC _{95%})	p	Exceso de costos ajustado por ITU resistente a cefalosporinas (coeficiente, IC _{95%})	p	Exceso de costos crudo por ITU resistente a carbapenémicos (coeficiente, IC _{95%})	p	Exceso de costos ajustado por ITU resistente a carbapenémicos (coeficiente, IC _{95%})	p
Total por atención hospitalaria	242 (-254 - 738)	0,339	193 (-347 - 734)	0,483	710 (0,686 - 1.418)	0,050	633 (-50 - 1.316)	0,069
Antibióticos	95 (39 - 150)	<0,001	97 (41 - 154)	<0,001	520 (259 - 782)	<0,001	509 (250 - 768)	<0,001
Otros medicamentos	111 (-101 - 323)	0,305	140 (-54 - 334)	0,156	-51 (-213 - 111)	0,537	-8 (-151 - 134)	0,910
Interconsultas	-4 (-18 - 11)	0,601	-9 (-23 - 6)	0,243	9 (-9 - 28)	0,319	10 (-7 - 28)	0,239
Exámenes de laboratorio	6 (-62 - 75)	0,855	-4 (-79 - 72)	0,925	-0,792 (-80 - 78)	0,984	-18 (-95 - 59)	0,649
Imágenes diagnósticas	-16 (-75 - 44)	0,603	-31 (-100 - 39)	0,388	44 (-46 - 134)	0,334	44 (-50 - 39)	0,356
Otros procedimientos	7 (-34 - 49)	0,728	1 (-33 - 36)	0,933	19 (-32 - 71)	0,464	43 (-6 - 92)	0,085
Estancia hospitalaria (habitación)	-23 (-268 - 223)	0,857	-57 (-273 - 159)	0,606	59 (-249 - 366)	0,708	11 (-226 - 248)	0,925

ITU: infecciones del tracto urinario

En negrilla, p<0,05

^a Modelo lineal generalizado ajustado por los días de hospitalización antes del diagnóstico de la infección, la bacteria aislada, las comorbilidades con las que ingresó el paciente y la muerte durante la hospitalización

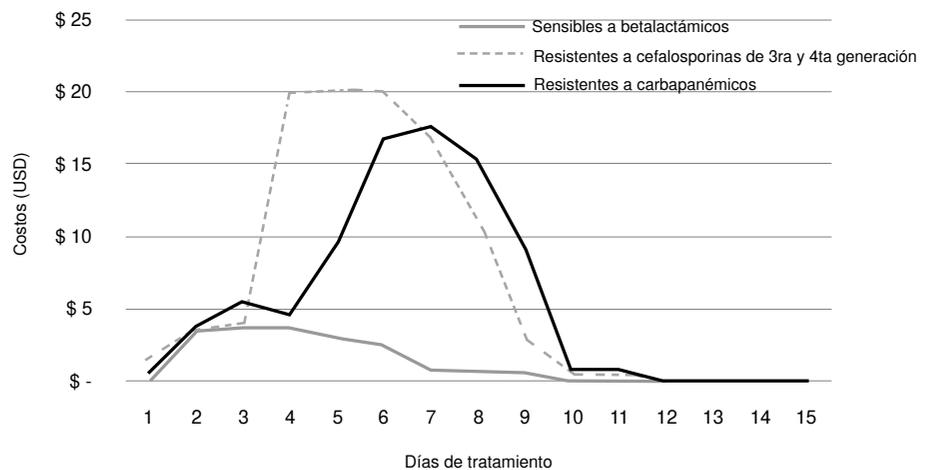


Figura 1. Distribución del exceso de los costos de antibióticos por día de los pacientes con infecciones del tracto urinario por bacterias sensibles a los betalactámicos, resistentes a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y a los carbapenémicos

En cuanto a los antibióticos suministrados después de finalizar la hospitalización, se encontró que, en el grupo con resistencia a las cefalosporinas, la mediana de días de tratamiento fue de 6 (RIC=4-7) y prevaleció el uso del meropenem por vía intravenosa. En el grupo con resistencia a los carbapenémicos, dicha mediana fue de 8 (RIC=5-10), y los antibióticos que se suministraron con mayor frecuencia fueron fosfomicina (un caso con fosfomicina más cefepime) y meropenem (dos casos con meropenem más polimixina B y otro con meropenem más fosfomicina), ambos por vía intravenosa.

Con respecto a las interconsultas, los exámenes de laboratorio, las imágenes diagnósticas, otros procedimientos y la estancia hospitalaria, los grupos con resistencia a los betalactámicos no presentaron excesos importantes en los costos, en comparación con el grupo con bacterias sensibles a los betalactámicos. Sin embargo, en el grupo con resistencia a las cefalosporinas, la frecuencia de las interconsultas por infectología fue de 10,2 % y, en aquel con resistencia a los carbapenémicos, fue de 65,6 %. Además, en ambos grupos con resistencia a los betalactámicos, se encontró una alta frecuencia de pruebas diagnósticas especializadas, como ultrasonografía de vías urinarias (26,5 y 40,6 %, respectivamente), tomografía computadorizada de abdomen y pelvis (4 y 15,6 %, respectivamente) y otros procedimientos como la inserción de catéter en la uretra (14,8 y 9,4 %, respectivamente).

Por último, en cuanto a la estancia hospitalaria y el tipo de habitación, el 2 % del grupo con resistencia a las cefalosporinas estuvo cuatro días o más en las salas de aislamiento y, el 24,5 %, en salas individuales durante ocho días o más; del grupo con resistencia a los carbapenémicos, el 43,8 % permaneció cuatro días o más en las salas de aislamiento y, el 21,9 %, en salas individuales ocho días o más.

Discusión

En este estudio, se pudo establecer que el costo total 'incremental' (sic) de las infecciones del tracto urinario por bacterias resistentes a cefalosporinas de tercera y cuarta generación fue de USD\$ 193 (IC_{95%} -347 a 734) y por bacterias resistentes a carbapenémicos fue de USD\$ 633 (IC_{95%} -50 a 1.316) en comparación con los costos por infecciones por bacterias sensibles a los betalactámicos.

Entre los costos hospitalarios considerados, la mayor diferencia se presentó con los antibióticos, los cuales generaron excesos de costos de USD\$ 97 (IC_{95%} 41-154) en el grupo de resistentes a las cefalosporinas y de USD\$ 509 (IC_{95%} 250-768) en el grupo de resistentes a los carbapenémicos.

Aunque estos resultados evidencian la considerable carga económica generada por la resistencia bacteriana en el hospital de estudio, no pueden generalizarse a otros grupos poblacionales debido a las particularidades epidemiológicas de persona, tiempo y lugar, y a las del manejo de las infecciones en los hospitales. De ahí la importancia de llevar a cabo estudios de este tipo para conocer y comparar la carga de la resistencia bacteriana en dichas instituciones.

Considerando que las infecciones del tracto urinario se cuentan entre las más frecuentes en el ámbito hospitalario y comunitario, el impacto económico que puede generar la resistencia a cefalosporinas y a carbapenémicos representa un grave problema para el sistema de salud de los países endémicos como Colombia. Por ello, ante la creciente complejidad de los tratamientos y la demanda de recursos sanitarios, cada vez son más necesarios los estudios que entreguen información comprobada para implementar estrategias encaminadas a aumentar la calidad de la atención y disminuir los costos hospitalarios (6,7).

Aunque en el mundo las infecciones del tracto urinario son de gran importancia por sus implicaciones clínicas y su alta prevalencia (1,4,15), a nivel local la situación es alarmante. En estudios previos en Medellín, se encontró que dichas infecciones están entre las más frecuentes causadas por bacilos Gram negativos resistentes a los betalactámicos, con porcentajes

de resistencia a los carbapenémicos de hasta 33,3 % (18,20) y de resistencia a las cefalosporinas de hasta 47,6 % (32,33), situación que genera un mayor impacto económico para las instituciones de salud y la comunidad, no solo por los costos hospitalarios (antibióticos, estancia hospitalaria, procedimientos quirúrgicos, entre otros), sino también por los costos sociales (pérdida de fuerza laboral y calidad de vida).

Actualmente, en algunos países de África y Latinoamérica, la frecuencia de infecciones del tracto urinario causadas por bacterias resistentes a las cefalosporinas alcanza el 25,5 y el 32,6 %, respectivamente (6,11). Asimismo, las causadas por bacterias resistentes a los carbapenémicos alcanzan hasta el 10,7 % en Corea (34), el 19 % en los Estados Unidos (12) y el 22 % en España (35), lo que demuestra que se trata de una problemática mundial.

La frecuencia de las infecciones del tracto urinario en la comunidad es cada vez más preocupante debido al aumento de bacilos Gram negativos resistentes a las cefalosporinas que, como ejemplos, llega hasta el 10,3 % en España (36) a 30 % en Latinoamérica (37) y a 40 % en Italia (38) en tanto que las infecciones por bacterias resistentes a los carbapenémicos alcanzan el 13 % en Italia (38) y el 51,4 % en Taiwán (39), lo que supone una gran carga financiera para los sistemas de salud (40).

Al comparar los costos 'incrementales' (sic) encontrados en este estudio con los de otros similares, se evidenció que, en el grupo con infecciones por bacterias resistentes a las cefalosporinas, el exceso fue menor a lo reportado en países como Estados Unidos (entre USD\$ 3.431 y USD\$ 16.451) (25,26,41) y España (€\$ 1.109) (27).

Además de las diferencias propias de cada país en términos sociales, políticos y económicos, las discrepancias metodológicas tienen un papel muy importante en estos estudios, dado que dificultan la comparación directa de los resultados obtenidos. Entre las principales diferencias metodológicas, se cuenta la conformación de los grupos de comparación (resistentes a cefalosporinas Vs. sensibles a cefalosporinas, infectados Vs. no infectados), la inclusión de distintas especies bacterianas (*Escherichia coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*) y las mediciones de los costos hospitalarios relacionados con el proceso de atención (algunos estudios incluyen estancia, medicamentos y laboratorio, y otros, solamente los costos totales de la hospitalización).

En cuanto al análisis de los costos, se encontró que la mayoría de los estudios se hicieron desde la perspectiva institucional. Las diferencias metodológicas en los estudios de costos se han convertido en una limitación para la comparación de los resultados que apoyen la adopción de decisiones, por lo cual se sugiere el diseño de consensos metodológicos que permitan obtener resultados comparables entre instituciones de salud de diferentes países.

En cuanto al exceso de costos, es poca la información disponible en torno a pacientes con infecciones causadas por bacilos Gram negativos resistentes a los carbapenémicos. El exceso de USD\$ 633 (IC_{95%} -50 a 1.316) obtenido en este estudio, refleja la carga económica que la resistencia a los carbapenémicos genera, sobre todo en ciudades endémicas como Medellín. Establecer las causas que contribuyen a la resistencia bacteriana y su impacto económico es importante para implementar medidas de prevención y control de las infecciones por agentes patógenos resistentes, y para optimizar el uso de los recursos de salud a corto, a mediano y a largo plazo (6,7).

En el presente estudio, los costos de las infecciones del tracto urinario por bacterias resistentes a las cefalosporinas o resistentes a los carbapenémicos fueron mayores que los de los pacientes con infecciones por bacterias sensibles a los betalactámicos, principalmente en cuanto al uso de antibióticos de amplio espectro como el meropenem, la fosfomicina y la colistina. Asimismo, se evidenció que solo el 3,7 % de los pacientes del grupo con resistencia a las cefalosporinas recibió tratamiento combinado con dos antibióticos, en tanto que el 37,5 % del grupo con resistencia a los carbapenémicos recibió tratamientos combinados con dos antibióticos, el 18,8 % con tres antibióticos y el 3,1 % con cuatro antibióticos.

Entre las causas que pueden explicar el aumento de los costos hospitalarios, se encuentra la frecuencia con que se administran los antibióticos de amplio espectro como el meropenem y la colistina, considerados por el Ministerio de Salud colombiano como medicamentos de alto costo en el mercado nacional en comparación con otros países.

Esta particularidad, sumada a los altos costos de otros medicamentos, llevó a la conformación de una comisión nacional de precios de medicamentos cuyo principal objetivo es salvaguardar la sostenibilidad del Sistema General de Seguridad Social en Salud (42). Actualmente, la lista de antibióticos regulados incluye el meropenem, la colistina y el linezolid, y aunque en este estudio se encontró que la fosfomicina se usaba con gran frecuencia, su costo (USD\$ 102) es menor que el de otros antibióticos de amplio espectro no regulados por el Ministerio de Salud, como la tigeciclina (USD\$ 556) y el imipenem (USD\$ 525) (42). El uso frecuente de este tipo de antibióticos evidencia las dificultades del tratamiento médico cuando las infecciones del tracto urinario son causadas por bacterias resistentes.

Otro hallazgo destacado en este estudio fue que la mayoría de las infecciones resistentes a las cefalosporinas o a los carbapenémicos se presentó en el momento de la hospitalización (59,4 y 75,5 %, respectivamente), lo cual evidencia la importancia que han cobrado estas infecciones en el ámbito comunitario (43) además, la importancia de llevar a cabo estudios que trasciendan el ámbito hospitalario y detecten posibles fuentes de infección, determinen la frecuencia de colonización por bacterias resistentes en la comunidad y describan las costumbres relacionadas con el uso de los antibióticos.

En el presente estudio también se observó que, después de su egreso, muchos de los pacientes con infecciones del tracto urinario resistentes a las cefalosporinas o a los carbapenémicos continuaron el tratamiento antibiótico por vía intravenosa en su lugar de residencia (44,9 y 21,9 %, respectivamente). Varios autores han mencionado que este programa reduce los costos de hospitalización, y tiene ventajas sociales y familiares (mayor intimidad y comodidad del paciente, integración de la familia en el proceso de curación), sanitarias (reducción de riesgos relacionados con la estancia hospitalaria) y de gestión (utilización de las camas hospitalarias). En algunos de los estudios se ha asociado dicha estrategia con una disminución de hasta 38 % de la mortalidad (44-47) Sin embargo, no existe información sobre el riesgo y las implicaciones que genera las medidas de hospitalización en casa de los pacientes con infecciones del tracto urinario por bacterias resistentes a las cefalosporinas o a los carbapenémicos, por lo cual es importante hacer estudios de costo-efectividad o costo-beneficio que determinen el impacto de esta intervención para las instituciones de salud y los convivientes (48-51).

Por último, se ha mencionado la importancia de las interconsultas de infectología en los hospitales, principalmente en la mejoría de la calidad de la prescripción y en el uso de los antibióticos (52-56). Debido a la complejidad del manejo de las infecciones causadas por microorganismos resistentes a las cefalosporinas o a los carbapenémicos, en este estudio, la frecuencia de interconsultas por infectología fue del 10,2 y 65,6 %, respectivamente. Aunque el número de interconsultas no fue significativamente alto, es importante resaltar que sus beneficios en términos de eficacia pueden ser mayores que los costos de la atención por parte de este tipo de profesionales en los centros asistenciales.

Una de las principales limitaciones de este estudio, y en general de los estudios de costos, es la ausencia de evaluaciones desde una perspectiva social que incluyan, no solo los costos relacionados con la atención hospitalaria, sino los gastos menores para el paciente e, incluso, la pérdida de fuerza laboral, relacionados directa o indirectamente con la infección (48,57).

Otra limitación del estudio fue que no se incluyeron infecciones del tracto urinario causadas por *E. coli*, uno de los principales agentes patógenos causante de estas infecciones, ya que el propósito del estudio era la estimación del impacto económico de las infecciones del tracto urinario causadas por bacilos Gram negativos resistentes a las cefalosporinas o a los carbapenémicos y en *E. coli* la resistencia a carbapenémicos es muy baja. Además, se recolectó información de una sola institución de salud, por lo cual estos resultados no pueden extrapolarse a otras.

En conclusión, los pacientes con infecciones del tracto urinario por bacterias resistentes a las cefalosporinas o a los carbapenémicos generaron mayores costos totales de hospitalización que aquellos infectados por bacterias sensibles a los betalactámicos, principalmente, por los antibióticos. La alta frecuencia de estas infecciones en el ámbito hospitalario y comunitario, sumada a la resistencia a los betalactámicos, aumenta los costos de la atención en salud y exige la implementación de estrategias que permitan disminuir los altos porcentajes de resistencia, como son las políticas de uso de antibióticos y el fortalecimiento de los programas de vigilancia.

Referencias

1. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13:269-84. <https://doi.org/10.1038/nrmicro343>
2. François M, Hanslik T, Dervaux B, Le Strat Y, Souty C, Vaux S, *et al.* The economic burden of urinary tract infections in women visiting general practices in France: A cross-sectional survey. *BMC Health Serv Res.* 2016;16:365. <https://doi.org/10.1186/s12913-016-1620-2>
3. Dielubanza EJ, Schaeffer AJ. Urinary tract infections in women. *Med Clin North Am.* 2011;95:27-41. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2010.08.023>
4. Pigrau C. Infecciones del tracto urinario nosocomiales. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31:614-24. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.015>
5. Pavanello Silva C, Frota Mendonça SH, Romero Aquino C, Soares da Silva AF, Malacchia JL, Campos Canesin A, *et al.* Principales factores de riesgo de infección del tracto urinario (ITU) en pacientes hospitalizados: propuesta de mejoras. *Enfermería Global.* 2009. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1695-61412009000100
6. El Bouamri MC, Arsalane L, El Kamouni Y, Zouhair S. Antimicrobial susceptibility of urinary *Klebsiella pneumoniae* and the emergence of carbapenem-resistant strains: A retrospective study from a university hospital in Morocco, North Africa. *Afr J Urol.* 2015;21:36-40. <https://doi.org/10.1016/j.afju.2014.10.004>

7. Zowawi HM, Harris PN, Roberts MJ, Tambyah PA, Schembri MA, Pezzani MD, *et al.* The emerging threat of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in urology. *Nat Rev Urol.* 2015;12:570-84. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2015.199>
8. Romero ED, Padilla TP, Hernández AH, Grande RP, Vázquez MF, García IG, *et al.* Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. producing multiple extended-spectrum β -lactamases. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;59:433-7. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.007>
9. Belmonte O, Drouet D, Alba J, Moiton MP, Kuli B, Lugagne-Delpon N, *et al.* Evolution of Enterobacteriaceae resistance to antibiotics in Reunion Island: emergence of extended-spectrum beta-lactamases. *Pathol Biol (Paris).* 2010;58:18-24. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.07.021>
10. Ben Haj Khalifa A, Khedher M. Epidemiological study of *Klebsiella* spp. uropathogenic strains producing extended-spectrum β -lactamase in a Tunisian urology hospital, 2009. *Pathol Biol (Paris).* 2012;60:e1-5. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2010.11.003>
11. Villegas MV, Correa A, Pérez F, Miranda MC, Zuluaga T, Quinn JP. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;49:217-22. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.03.001>
12. Khawcharoenporn T, Vasoo S, Singh K. Urinary tract infections due to multidrug-resistant Enterobacteriaceae: Prevalence and risk factors in a Chicago emergency department. *Emerg Med Int.* 2013;2013:e258517. <https://doi.org/10.1155/2013/258517>
13. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:657-86. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
14. World Health Organization. Antimicrobial resistance: Global report on surveillance 2014. Fecha de consulta: 28 de septiembre de 2015. Disponible en: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
15. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med.* 2002;113(Suppl.1A):5S-13S.
16. Stone PW, Braccia D, Larson E. Systematic review of economic analyses of health care-associated infections. *Am J Infect Control.* 2005;33:501-9. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(02\)01054-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(02)01054-9)
17. Grupo para el Estudio de la Resistencia a Antibióticos de Medellín. Microorganismos. Fecha de consulta: 28 de septiembre de 2015. Disponible en: <http://www.grupogermen.org/microorganismos.html>
18. Vanegas JM, Cienfuegos AV, Ocampo AM, López L, del Corral H, Roncancio G, *et al.* Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemases in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellín, Colombia. *J Clin Microbiol.* 2014;52:3978-86. <https://doi.org/10.1128/JCM.01879-14>
19. Vanegas JM, Parra OL, Jiménez JN. Molecular epidemiology of carbapenem resistant Gram-negative bacilli from infected pediatric population in tertiary-care hospitals in Medellín, Colombia: An increasing problem. *BMC Infect Dis.* 2016;16:463. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1805-7>
20. Ocampo AM, Chen L, Cienfuegos AV, Roncancio G, Chavda KD, Kreiswirth BN, *et al.* A two-year surveillance in five Colombian tertiary care hospitals reveals high frequency of non-CG258 clones of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with distinct clinical characteristics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;60:332-42. <https://doi.org/10.1128/AAC.01775-15>
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
22. Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Falagas ME. Impact of antimicrobial multidrug resistance on inpatient care cost: An evaluation of the evidence. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11:321-31. <https://doi.org/10.1586/eri.13.4>
23. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *J Chronic Dis.* 1987;40:373-83.
24. Centers for Disease Control and Prevention. Identifying healthcare-associated infections (HAI) for NHSN surveillance. Fecha de consulta: 9 de enero de 2015. Disponible en: http://www.cdc.gov/nhsn/PDFs/pscManual/2PSC_IdentifyingHAIs_NHSNcurrent.pdf

25. MacVane SH, Tuttle LO, Nicolau DP. Impact of extended-spectrum β -lactamase-producing organisms on clinical and economic outcomes in patients with urinary tract infection. *J Hosp Med*. 2014;9:232-8. <https://doi.org/10.1002/jhm.2157>
26. Lee SY, Kotapati S, Kuti JL, Nightingale CH, Nicolau DP. Impact of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species on clinical outcomes and hospital costs: A matched cohort study. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006;27:1226-32. <https://doi.org/10.1086/507962>
27. Esteve-Palau E, Solande G, Sánchez F, Sorlí L, Montero M, Güerri R, *et al*. Clinical and economic impact of urinary tract infections caused by ESBL-producing *Escherichia coli* requiring hospitalization: A matched cohort study. *J Infect*. 2015;71:667-74. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.08.012>
28. Cardwell SM, Crandon JL, Nicolau DP, McClure MH, Nailor MD. Epidemiology and economics of adult patients hospitalized with urinary tract infections. *Hosp Pract (1995)*. 2016;44:33-40. <https://doi.org/10.1080/21548331.2016.1133214>
29. Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud. Manual para la elaboración de evaluaciones económicas en salud. Fecha de consulta: 28 de septiembre de 2015. Disponible en: <http://www.iets.org.co/manuales>
30. Banco de la República. Tasa de cambio del peso colombiano (TRM). Fecha de consulta: 28 de septiembre de 2016. Disponible en: <http://www.banrep.gov.co/es/trm>
31. Donado-Campos JM, Rodríguez-Arango GO. Epidemiología y metodología científica aplicada a la pediatría (III): introducción al análisis estadístico en epidemiología. *An Esp Pediatr*. 1999;50:81-90.
32. Jiménez-Jiménez J, Jiménez JG, Barrera ME, Arias JK, Velilla DM, Marín AE, *et al*. Caracterización clínica, microbiológica y de sensibilidad a antimicrobianos en pacientes con infección nosocomial del tracto urinario: cuatro años y medio de vigilancia epidemiológica. *Med UNAB*. 2012;14.
33. Orrego-Marín CP, Henao-Mejía CP, Cardona-Arias JA. Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. *Acta Médica Colombiana*. 2014;39:352-8.
34. Song JY, Cheong HJ, Choi WS, Heo JY, Noh JY, Kim WJ. Clinical and microbiological characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections. *J Med Microbiol*. 2011;60:605-11. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.029439-0>
35. Álvarez-Otero J, Lamas-Ferreiro JL, González-González L, Rodríguez-Conde I, Fernández-Soneira MJ, Arca-Blanco A, *et al*. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urine cultures: Prevalence and risk factors. *Rev Espanola Quimioter*. 2017;30:183-94.
36. Boix-Palop L, Xercavins M, Badía C, Obradors M, Riera M, Freixas N, *et al*. Emerging extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* causing community-onset urinary tract infections: A case-control study. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;50:197-202. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.009>
37. Bours PHA, Polak R, Hoepelman AIM, Delgado E, Jarquin A, Matute AJ. Increasing resistance in community-acquired urinary tract infections in Latin America, five years after the implementation of national therapeutic guidelines. *Int J Infect Dis*. 2010;14:e770-4. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.02.2264>
38. Salerno F, Borzio M, Pedicino C, Simonetti R, Rossini A, Boccia S, *et al*. The impact of infection by multidrug-resistant agents in patients with cirrhosis. A multicenter prospective study. *Liver Int*. 2017;37:71-9. <https://doi.org/10.1111/liv.13195>
39. Zilberberg MD, Nathanson BH, Sulham K, Fan W, Shorr AF. Carbapenem resistance, inappropriate empiric treatment and outcomes among patients hospitalized with Enterobacteriaceae urinary tract infection, pneumonia and sepsis. *BMC Infect Dis*. 2017;17:279. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2383-z>
40. Brizendine KD, Richter SS, Cober ED, van Duin D. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection following solid organ transplantation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:553-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.04284-14>
41. Cardwell SM, Crandon JL, Nicolau DP, McClure MH, Nailor MD. Epidemiology and economics of adult patients hospitalized with urinary tract infections. *Hosp Pract 1995*. 2016;44:33-40. <https://doi.org/10.1080/21548331.2016.1133214>
42. Ministerio de Salud y Protección Social. Regulación de precios de medicamentos, 2015. Fecha de consulta: 6 de febrero de 2017. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/salud/MT/Paginas/medicamentos-regulacion-precios.aspx>

43. Hoyos Á, Serna L, Ortiz G, Aguirre J. Infección urinaria adquirida en la comunidad en pacientes pediátricos: clínica, factores de riesgo, etiología, resistencia a los antibióticos y respuesta a la terapia empírica. *Infectio*. 2012;16:94-103. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(12\)70062-0](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70062-0)
44. González-Ramallo VJ, Valdivieso-Martínez B, Ruiz-García V. Hospitalización a domicilio. *Med Clín(Barc)*. 2002;118:659-64. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(02\)72488-3](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(02)72488-3)
45. Alonso G, Escudero JM. La unidad de corta estancia de urgencias y la hospitalización a domicilio como alternativas a la hospitalización convencional. *An Sist Sanit Navar*. 2010;33:97-106.
46. Cryer L, Shannon SB, Amsterdam MV, Leff B. Costs for 'hospital at home' patients were 19 percent lower, with equal or better outcomes compared to similar inpatients. *Health Aff (Millwood)*. 2012;31:1237-43. <https://doi.org/10.1377/hlthaff.2011.1132>
47. Shepperd S, Doll H, Angus RM, Clarke MJ, Iliffe S, Kalra L, *et al*. Avoiding hospital admission through provision of hospital care at home: A systematic review and meta-analysis of individual patient data. *CMAJ*. 2009;180:175-82. <https://doi.org/10.1503/cmaj.081491>
48. Cohen B, Larson EL, Stone PW, Neidell M, Glied SA. Factors associated with variation in estimates of the cost of resistant infections. *Med Care*. 2010;48:767-75. <https://doi.org/10.1097/MLR.0b013e3181e358b9>
49. García-Altés A, Navas E, Soriano MJ. Evaluación económica de intervenciones de salud pública. *Gac Sanit*. 2011;25:25-31. [https://doi.org/10.1016/S0213-9111\(11\)70005-X](https://doi.org/10.1016/S0213-9111(11)70005-X)
50. Coast J, Smith R, Karcher A-M, Wilton P, Millar M. Superbugs II: How should economic evaluation be conducted for interventions which aim to contain antimicrobial resistance? *Health Econ*. 2002;11:637-47.
51. Shang J, Ma C, Poghosyan L, Dowding D, Stone P. The prevalence of infections and patient risk factors in home health care: A systematic review. *Am J Infect Control*. 2014;42:479-84. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2013.12.018>
52. Cisneros JM, Palomino-Nicás J, Pachón-Díaz J. La interconsulta de enfermedades infecciosas es una actividad clave para los servicios y unidades de enfermedades infecciosas y para el hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32:671-5. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.019>
53. Lo E, Rezai K, Evans AT, Madariaga MG, Phillips M, Brobbey W, *et al*. Why don't they listen? Adherence to recommendations of infectious disease consultations. *Clin Infect Dis*. 2004;38:1212-8. <https://doi.org/10.1086/383315>
54. Rodríguez-Baño J, Paño-Pardo JR, Álvarez-Rocha L, Asensio Á, Calbo E, Cercenado E, *et al*. Programas de optimización de uso de antimicrobianos (PROA) en hospitales españoles: documento de consenso GEIH-SEIMC, SEFH y SEMPSPH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:e1-22.e23. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.018>
55. Pulcini C, Botelho-Nevers E, Dyar OJ, Harbarth S. The impact of infectious disease specialists on antibiotic prescribing in hospitals. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:963-72. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12751>
56. Cassenote AJ, Scheffer MC, Segurado AA, Cassenote AJ, Scheffer MC, Segurado AA. Brazilian infectious diseases specialists: Who and where are they? *Braz J Infect Dis*. 2016;20:141-8. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.10.009>
57. Gandra S, Barter DM, Laxminarayan R. Economic burden of antibiotic resistance: How much do we really know? *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:973-80. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12798>

Original article

A common *Salmonella* Enteritidis sequence type from poultry and human gastroenteritis in Ibagué, Colombia

Luz Clemencia Fandiño¹, Noel Verjan-García^{1,2}

¹ Grupo de Investigación en Avicultura, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia

² Grupo de Investigación en Inmunobiología y Patogénesis, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia

Introduction: *Salmonella* Enteritidis is a major cause of human salmonellosis in the world, with contaminated eggs and raw chicken meat as the main routes of infection. The main *Salmonella* spp. serovars circulating in laying hen farms, the surface of eggs, and in raw chicken carcasses have been identified in Ibagué, Colombia. However, it is unknown whether those serovars are responsible for human gastroenteritis.

Objective: To evaluate the genetic relationship between gastroenteritis and *Salmonella* Enteritidis isolates from poultry and humans using multilocus sequence typing (MLST).

Materials and methods: *Salmonella* spp. was isolated from clinical cases of gastroenteritis (n=110). Antibiotic susceptibility tests, followed by serotyping and MLST were conducted and *S. Enteritidis* was compared to those from laying hen farms and marketed eggs.

Results: Ten isolates of *Salmonella* spp. were obtained from the stools of people with gastroenteritis. The prevalence of *Salmonella* spp. in human stools was 9.09%, and *S. Enteritidis* (n=4), *S. Typhimurium* (n=2), *S. Newport* (n=1), *S. Uganda* (n=1), *S. Gruposensis* (n=1), and *S. Braenderup* (n=1) were the main serotypes. MLST indicated that a common *S. Enteritidis* sequence type (ST11) was present in all three sources and showed the same antibiotic resistance pattern.

Conclusion: *Salmonella* Enteritidis ST11 constitutes a link between consumption and manipulation of contaminated eggs and human gastroenteritis in Ibagué. Additional studies would be required to establish if other *Salmonella* serovars isolated from raw chicken meat are also associated with human gastroenteritis.

Keywords: *Salmonella*; poultry; multilocus sequence typing; serogroup; gastroenteritis.

Un tipo de secuencia común de *Salmonella* Enteritidis de origen aviar y de humano con gastroenteritis en Ibagué, Colombia

Introducción. *Salmonella* Enteritidis es una de las mayores causas de salmonelosis en el mundo; los huevos contaminados y la carne de pollo cruda son sus principales fuentes de infección. En Ibagué, Colombia, se han identificado los principales serovares que circulan en granjas, superficies de huevos y canales de pollo, pero se desconoce si esos serovares son responsables de la gastroenteritis.

Objetivo. Evaluar la relación genética entre los aislamientos de *Salmonella* Enteritidis de aves de corral y de humanos con la gastroenteritis mediante tipificación de *multiloci* de secuencias (*Multilocus Sequence Typing*, MLST).

Materiales y métodos. Se aisló *Salmonella* spp. de casos clínicos de gastroenteritis (n=110). Se hizo la prueba de sensibilidad antibiótica, así como la serotipificación y la tipificación mediante MLST, y se comparó *S. Enteritidis* de humanos con la hallada en granjas de gallinas ponedoras y en huevo comercializado (n=6).

Resultados. Se aislaron 10 cepas de *Salmonella* spp. a partir de heces de humanos con gastroenteritis. Se obtuvo una prevalencia de *Salmonella* spp. de 9,09%, y se identificaron los serotipos *S. Enteritidis* (n=4), *S. Typhimurium* (n=2), *S. Newport* (n=1), *S. Gruposensis* (n=1), *S. Uganda* (n=1) y *S. Braenderup* presentes en pacientes con gastroenteritis. Mediante la MLST, se comprobó que un tipo de secuencia común (ST11) de *S. Enteritidis* estuvo presente en todas las tres fuentes y presentó el mismo patrón de resistencia antibiótica.

Conclusión. *Salmonella* Enteritidis ST11 constituye un vínculo entre el consumo y la manipulación de huevos contaminados, y la gastroenteritis en humanos en Ibagué. Se requieren estudios complementarios para conocer si otros serovares de *Salmonella* aislados de carne de pollo cruda también se asocian con la gastroenteritis en humanos.

Palabras clave: *Salmonella*, aves de corral, tipificación de secuencias multilocus, serogrupos, gastroenteritis.

Received: 28/09/17
Accepted: 30/07/18
Published: 21/08/18

Citation:

Fandiño L, Verjan-García N. A common *Salmonella* Enteritidis sequence type from poultry and human gastroenteritis in Ibagué, Colombia. Biomédica. 2019;39(Supl.1):50-62
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i1.4155>

Corresponding author:

Noel Verjan-García, Departamento de Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad del Tolima, Altos de Santa Helena, Ibagué, Colombia
Telephone: (578) 277 1212
nverjang@ut.edu.co

Author contributions:

Both authors contributed to the research and the drafting of the manuscript.

Funding:

This research was funded by grants from the *Oficina Central de Investigaciones de la Universidad del Tolima* to Noel Verjan-García (projects N° 780213 and 460113).

Conflict of interest

The authors reported no potential conflicts of interest.

Salmonellosis is a widely distributed food-borne disease caused by subspecies I of *Salmonella enterica*. Subspecies I groups over 1,547 serovars that are pathogenic to humans and animals (1,2).

Non-typhoidal *Salmonella* usually causes self-limiting gastroenteritis and under certain conditions, it may cause invasive extra-intestinal infections (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin*, and *S. Heidelberg*, among others), whereas typhoidal *Salmonella* (*S. Typhi* and *S. Paratyphi* A, B, and C) causes enteric fever (3). Non-typhoidal *Salmonella* infection may progress to a life-threatening disease when the bacteria reach the bloodstream, particularly in young children, the elderly, and immunocompromised people (4).

Salmonella Enteritidis and *S. Typhimurium* are responsible for the majority of clinical cases of human salmonellosis worldwide (5-7). Those serovars are mostly transmitted through the consumption and manipulation of contaminated food, such as eggs and raw chicken meat (8,9).

Non-typhoidal *Salmonella* was estimated to be responsible for about 80.3 million cases of food-borne gastroenteritis and 155,000 deaths each year in the world (10). In the United States, non-typhoidal *Salmonella* may cause up to 1 million cases of disease, 19,586 hospitalizations, and 378 deaths annually (11,12). Non-typhoidal *Salmonella* also prevalent in other developed countries including Canada, where *S. Infantis* caused 110 clinical cases between 2015 and 2016 (13). In the United Kingdom, *S. Enteritidis* (33.4%) and *S. Typhimurium* (21.4%) were the main serovars isolated from 799 fecal specimens during October, 2016 (14). Despite the decreasing trend of human salmonellosis cases in the European Union since 2008 (15), human cases of *S. Enteritidis* MLVA profile 2-9-7-3-2 increased in the Netherlands, Belgium, Denmark, Norway, Sweden, the United Kingdom, and other European countries, where eggs originating in Poland were identified as the vehicle of infection (16).

Salmonellosis in Colombia may also have a high prevalence. However, the disease is not properly notified or reported to the health-care centers, which usually lack the appropriate laboratories for correct identification and depend on a centralized laboratory at the *Instituto Nacional de Salud* in Bogotá to obtain complete identification. Thus, the impact of the bacteria on public health is not accurately known in many regions of the country.

The *Instituto Nacional de Salud* reported a total of 10,381 cases of foodborne illnesses during 2015 and a similar number during 2016 of which only 15% were confirmed by laboratory tests. The Institute also reported 7,219 *Salmonella* isolates from clinical cases, with *S. Typhimurium* (33.7%), *S. Enteritidis* (28.6%), and *S. Typhi* (9.2%) being the most prevalent serotypes (17).

In the Tolima region, preliminary epidemiological studies have established the presence of *Salmonella* in different segments of the poultry industry reporting *S. Enteritidis* and *S. Shannon* in laying hen farms (18), *S. Enteritidis* in eggshells surfaces at the market place (19), and a total of 14 different *Salmonella* serovars present in chicken carcasses sold at stores and supermarkets in the city of Ibagué (20) that included *S. Paratyphi* B, *S. Hvitittingfoss*, *S. Muenster*, *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Heidelberg*, *S. Braenderup*, and *S. Kalina*, among others, but not *S. Enteritidis*. Among those serovars, *S. Paratyphi* B and *S. Heidelberg* were found as the most prevalent in broiler farms in the regions of Santander and Cundinamarca (21).

Although those studies were useful to increase the awareness about the risk of *Salmonella* in poultry producers, the genetic relationship among those poultry isolates and the *Salmonella* causing gastroenteritis in humans has not been addressed. In addition, the absence of a causal relationship between *Salmonella* and the consumption or manipulation of poultry products has impeded the implementation of more rigorous diagnostic and surveillance programs to prevent the infection by this bacterium.

Given the discriminatory power of molecular tools, this study was designed to evaluate the genetic relationship between *S. Enteritidis* isolates from poultry and from humans with gastroenteritis in the city of Ibagué by using multilocus sequence typing (MLST), a highly discriminative technique used for microbial subtyping in epidemiological investigations, population biology, and studies on the evolution of pathogenicity-related traits of bacteria (22,23).

Materials and methods

Study design

We conducted an observational cross-sectional study between August and December, 2015, to establish the preliminary prevalence of *Salmonella* spp. in stool samples from clinical cases of patients with gastroenteritis that were admitted to local health care centers in Ibagué (department of Tolima), Colombia. For the purpose of this investigation, the physicians agreed to share the clinical samples with the *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia* at the *Universidad del Tolima*.

The sample size was calculated by the formula described by Thrusfield (24) with a 95% confidence level, 5% error, and expected prevalence of 5% as no systematic studies on *Salmonella* causing diarrhea in humans in the Tolima region were found. The calculated sample size was 73 and we collected 110 stool samples. The *Instituto Nacional de Salud* had reported that *Salmonella* spp. had been isolated in 18 of 87 biologic samples during week 52 with an average of 199 cases per week and a total of 10,381 human cases from 895 foodborne outbreaks during 2015 (17). Based on this information, the sample size was considered sufficient to establish the preliminary prevalence of *Salmonella* in the city.

Biological material

The sampling included two health care centers where we collected 110 stool samples for *Salmonella* isolation. Each fecal sample was stored in aseptic plastic bottles at the health care center and then transported in ice (<4 °C) to the *Laboratorio de Diagnóstico Veterinario* at *Universidad del Tolima* and processed within two hours. In addition, three *S. Enteritidis* (UTS. Enteritidis 13001-13003) isolates obtained from the eggshell surface of eggs sold in stores and supermarkets (19), as well as another three isolated from crushed eggshells (UTS. Enteritidis 14048-14050) in laying farms (18) were also included in the study.

Isolation of *Salmonella* from human stool samples

For the isolation of *Salmonella* spp. we followed the *Instituto Nacional de Salud* protocol and the standard international guidelines from ISO 6579:2002/ Amd1:2007. Stool samples (swabs) were briefly seeded directly in Müller-Kauffmann tetrathionate broth™ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and incubated at 37°C; a second aliquot was inoculated in Rappaport Vassiliadis

broth™ (Merck) and incubated at 42°C for 18 hours. Later, bacterial colonies were seeded in the highly selective media Xylose Lysine Tergitol 4 (XLT4) agar™ (Merck) and the low selective media SS (*Salmonella-Shigella*) and McConkey agar™ (Merck) and incubated at 37 °C for 18-24 hours.

Subsequently, compatible colonies were seeded in chromogenic Rambach agar™ (Merck) and confirmed as *Salmonella* spp. by using the miniaturized biochemical BBL Crystal test™ (E/NF) for non-fermenter enteric bacteria. *Salmonella* isolates were also confirmed by agglutination with Poli A-I + Vi™ (Difco 222641, Becton Dickinson & Co, Sparks, MD, USA) antibodies. Positive controls included *S. Typhimurium* ATCC 14028, and *S. Enteritidis* ATCC 13076.

Serotyping of *Salmonella* spp. isolates

Salmonella spp. isolates were serotyped by using the White-Kauffman-Le Minor scheme, which identifies the presence of specific somatic (O) and flagellar (H) antigens with commercial antisera (Difco, Becton Dickinson and Co., Sparks, MD, USA). Serotyping was performed based on the antigenic description by Grimont and Weill (2007) (1) and the nomenclature described by Tindall, *et al.* (25), and by the Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. The procedure was carried out at the *Instituto Colombiano de Agricultura*.

Antibiotic susceptibility tests

The Kirby-Bauer method (agar-disc diffusion) was used to assess the susceptibility of *Salmonella* to chloramphenicol (CHL, 30 µg), florfenicol (FFC, 30 µg), enrofloxacin (ENR, 5 µg), norfloxacin (NOR, 10 µg), fosfomicin (FOF, 50 µg), and streptomycin (STR, 10 µg), which are antibiotics commonly used in veterinary medicine but not included in the automated microdilution Phoenix™ (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) method. A bacterial suspension in Mueller-Hinton II agar™ (BBL) was calibrated according to the 0.5 McFarland scale of turbidity and the bacterial growth inhibition at 37 °C for 18 to 24 hours was evaluated according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (26).

Salmonella isolates were also subjected to an antimicrobial microdilution susceptibility test by using the BD Phoenix NMIC/ID-94 panels™ (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) and the categories established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (26).

The antibiotics used in this assay and their concentration were amikacin (AMK, 8-32 µg/ml), amoxicillin-clavulanate (AMC, 4/2-16/8 µg/ml), ampicillin (AMP, 4-16 µg/ml), cefepime (FEP, 1-16 µg/ml), ceftazidime (CAZ, 1-16 µg/ml), ceftriaxone (CRO, 1-32 µg/ml), cefuroxime (CXM, 4-16 µg/ml), ciprofloxacin (CIP, 0.5-2 µg/ml), ertapenem (ETP, 0.25-4 µg/ml), gentamicin (GEN, 2-8 µg/ml), imipenem (IPM, 1-8 µg/ml), levofloxacin (LVX, 1-4 µg/ml), meropenem (MEM, 1-8 µg/ml), piperacillin-tazobactam (TZP, 4/4- 64/4 µg/ml), tigecycline (TGC, 1-4 µg/ml), and trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 1/19 - 4/76).

Salmonella isolates with absolute resistance were the only ones considered as resistant strains. Multi-drug resistant strains of *Salmonella* were defined as those showing phenotype resistance to at least three classes of antibiotics. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as the reference strain.

Polymerase chain reaction

The molecular analysis was performed at the *Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular* of the *Universidad del Tolima*. Genomic DNA was extracted from each *Salmonella* isolate by the phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) method (27). All nine *Salmonella* isolates were subjected to PCR amplification of a 284 bp fragment of the *invA* gene for *Salmonella* genus confirmation using the forward 5'-GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA-3' and reverse 5'-TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3' primers™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.) described by Rahn, *et al.* (28).

The PCR reaction was performed in a total volume of 25 µl using the AccuPrime Taq DNA polymerase system™ (Invitrogen Life Technologies), containing 2.5 µl MgCl₂ (50 mM), 2.5 µl 10 × buffer, 0.8 µl of each primer (10 µM), 2.5 µl of dNTP (8 mM), 0.5 µl Taq DNA polymerase, and 1 µl of DNA (200 ng) template. Amplification was carried out in a T-100 (Bio-Rad) thermal cycler with the following program: An initial denaturation step at 95 °C for five minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for one minute, annealing at 55 °C for 30 seconds, an extension at 68 °C for 30 seconds, and a final extension step at 68 °C for seven minutes. The PCR products were mixed with 2 µl of 10× loading buffer and then resolved by electrophoresis on 2% agarose gel with 100 bp DNA ladder™ (Invitrogen). The gel was stained with ethidium bromide and visualized under the UV light by using an ENDURO GDS™ (Labnet International, Inc.) gel documentation system.

Multilocus sequence typing of *Salmonella* Enteritidis isolates

Three *S. Enteritidis* strains isolated from human stools, three *S. Enteritidis* strains isolated from eggs sold at stores and supermarkets (19), and another three isolated from crushed eggshells from laying hen farms were randomly selected and a total of nine *S. Enteritidis* were subjected to the Achtman scheme of PCR amplification and sequencing of seven housekeeping genes (29).

The gene was analyzed by encoding the aspartokinase + homoserine dehydrogenase (*thrA*), phosphoribosyl aminoimidazole carboxylase (*purE*), alpha ketoglutarate dehydrogenase (*sucA*), histidinol dehydrogenase (*hisD*), chorismate synthase (*aroC*), uroporphyrinogen III cosynthase (*hemD*), and DNA polymerase III beta subunit (*dnaN*) with the primers described on the MLST website (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst>).

The PCR reaction was done as described previously under the following conditions: An initial denaturation step at 94 °C for three minutes, followed by 35 cycles at 94 °C for one minute, 55 °C for one minute, and 72 °C for one minute, with a final extension step at 72 °C for five minutes. PCR products were purified using a DNA purification kit™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.) and subsequently sequenced (Macrogen Inc., Korea) in both directions using the Sanger sequencing method. The DNA sequences were assembled using Genetyx, version 7.0, software and submitted to the online *Salmonella* MLST database of the University of Warwick to obtain allelic profiles and the specific sequence type of each isolate.

Nucleotide sequence analysis

The DNA sequence data of seven housekeeping genes from *Salmonella* were compared individually with those in the GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) database using the BLASTN (version 2.5.1+) software (30) of the National Center for Biotechnology Information. Multi-alignment of nucleotide sequences

was carried out with BioEdit, version 7.0.5, and Genetyx, version 7, and the phylogenetic analysis was performed with the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 6 (31) using the maximum likelihood method.

Results

Isolation and serovars of Salmonella spp. from human stool samples

A total of 10 *Salmonella* spp. were isolated from 110 human stool samples collected in Ibagué. We found a *Salmonella* prevalence of 9.09% in patients with gastroenteritis. The biochemical and agglutination tests with polyclonal anti-Vi-A antibodies and amplification of 284 bp of the *invA* gene by PCR confirmed the identification of *Salmonella* genus. From these 10 *Salmonella* isolates, six different serovars of *Salmonella enterica* were identified. *Salmonella* Enteritidis (4/10) and *S. Typhimurium* (2/10) were the predominant serovars, followed by *S. Newport*, *S. Braenderup*, *S. Uganda*, and *S. Gruposensis*, each one with one isolate (table 1).

Antibiotic susceptibility test

All *Salmonella* isolated from humans with gastroenteritis showed resistance to two classes of antibiotics: Aminoglycosides (amikacin and gentamicin), and cephalosporin (cefoxitin and cefuroxime). Only one *S. Typhimurium* was found to be multi-drug resistant to at least nine antibiotics including amikacin, ampicillin, cefoxitin, cefuroxime, gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and florfenicol.

Table 1. Serovars and sequence types of *Salmonella* Enteritidis isolated from poultry and humans with gastroenteritis in Ibagué, Colombia

Salmonella code	Source	Sample	Serovar	Allele	Sequence type	Sequence type complex
UTS. Enteritidis 13001	Laying hen farm	Crushed eggshell	S. Enteritidis	aroC 5, dnaN 2, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA653	ST3172	Unknown
UTS. Enteritidis 13002	Laying hen farm	Crushed eggshell	S. Enteritidis	aroC 5, dnaN 2, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA11	ST11	4
UTS. Enteritidis 13003	Laying hen farm	Crushed eggshell	S. Enteritidis	aroC 5, dnaN 2, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA11	ST11	4
UTS. Enteritidis 14048	Wet market	Egg shell surface wash	S. Enteritidis	aroC 5, dnaN 2, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA11	ST11	4
UTS. Enteritidis 14049	Wet market	Egg shell surface wash	S. Enteritidis	aroC 5, dnaN 2, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA11	ST11	4
UTS. Enteritidis 14050	Wet market	Egg shell surface wash	S. Enteritidis	aroC 5, dnaN 584, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA11	ST3233	Unknown
UTS. Enteritidis 15001	Human	Stool sample	S. Enteritidis	aroC 5, dnaN 2, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA11	ST11	4
UTS. Enteritidis 15002	Human	Stool sample	S. Enteritidis	aroC 5, dnaN 2, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA11	ST11	4
UTS. Enteritidis 15003	Human	Stool sample	S. Enteritidis	aroC 5, dnaN 2, hemD 3, HisD7, purE 6, sucA 6, thrA11	ST11	4
UTS. Enteritidis 15004	Human	Stool sample	S. Enteritidis	U	U	U
UTST-15020	Human	Stool sample	S. Typhimurium	U	U	U
UTSN-15021	Human	Stool sample	S. Newport	U	U	U
UTSB-15022	Human	Stool sample	S. Typhimurium	U	U	U
UTSB-15023	Human	Stool sample	S. Braenderup	U	U	U
UTSU-15024	Human	Stool sample	S. Uganda	U	U	U
UTSG-15025	Human	Stool sample	S. Gruposensis	U	U	U

U: Undetermined

* Crushed eggshell

** Eggs collected at the market place

On the other hand, all *Salmonella* isolates were susceptible to amoxicillin/clavulanate, cefepime, ceftazidime, ceftriaxone, ciprofloxacin, ertapenem, imipenem, levofloxacin, meropenem, piperacillin/tazobactam, and tigecycline. Additionally, all *S. Enteritidis*, *S. Braenderup*, *S. Newport*, *S. Gruposensis*, *S. Uganda*, and one *S. Typhimurium* isolate were also susceptible to streptomycin, chloramphenicol, florfenicol, enrofloxacin, norfloxacin and phosphomycin tested by the Kirby-Bauer method.

Multilocus sequence typing

Nine randomly selected isolates of *S. Enteritidis* from both poultry and humans were subjected to MLST analysis. The identified sequence types were ST3172, ST11, and ST3233 with ST11 being the most frequent sequence type present in laying hen farms (2/3), on the surface of commercialized eggs (2/3) and in human stool samples (3/3) (table 1). Variations in the sequences of the genes *thrA* and *dnaN* appeared to be responsible for the emergence of the sequence types ST3172 and ST3233 whereas consistency in the DNA sequence of the *aroC* gene allowed further phylogenetic analyses.

Phylogenetic analysis

The *aroC* gene from all seven housekeeping genes was selected for further phylogenetic analysis. The phylogenetic tree obtained with the *aroC* gene sequences from *Salmonella* isolated in Tolima and those deposited in GenBank showed a singular cluster (cluster I, figure 1) composed of *S. Enteritidis* from human stool samples (n=3), *S. Enteritidis* from eggshell surfaces (n=3), and one isolate obtained from laying hen farms (UTS. Enteritidis 13001) that branched from one of the *S. Enteritidis* UTS. Enteritidis 13003 isolates obtained from laying hen farms. A second cluster was composed of *S. Enteritidis* isolated from laying hen farms (UTS. Enteritidis 13002) clustered together with *S. enterica* FORC_019, *S. Paratyphi* A, and *S. Typhimurium* LT2 reference strains (cluster II, figure 1), whereas the other reference strains formed an independent cluster (figure 1).

Discussion

Salmonella Enteritidis and *S. Typhimurium* are the predominant cause of non-typhoidal *Salmonella* in humans worldwide and this situation may be the same in many regions in Colombia where very limited epidemiological studies have addressed the potential link between poultry and human salmonellosis and no routine microbiological isolation tests are conducted due to the lack of appropriate laboratory facilities. Although such epidemiological information to support the sources of human isolates is still lacking in Colombia, to our knowledge this is the first report describing a common *S. Enteritidis* sequence type ST11 with an identical antibiotic resistance pattern in poultry, especially commercial eggs, and stools from humans with gastroenteritis, which suggests that commercial eggs play a role in the transmission of non-typhoidal salmonellosis in Ibagué.

Six different serovars of non-typhoidal *S. enterica* were isolated from 10 positive stool samples of people with gastroenteritis in Ibagué, Colombia (table 1). The serovars *S. Newport*, *S. Braenderup*, and *S. Typhimurium* were also isolated from raw chicken carcasses marketed in Ibagué (20), whereas *S. Uganda* and *S. Gruposensis* were novel serovars identified in the Tolima region. In addition, most of these serovars had been isolated from poultry in the region of Cundinamarca (32).

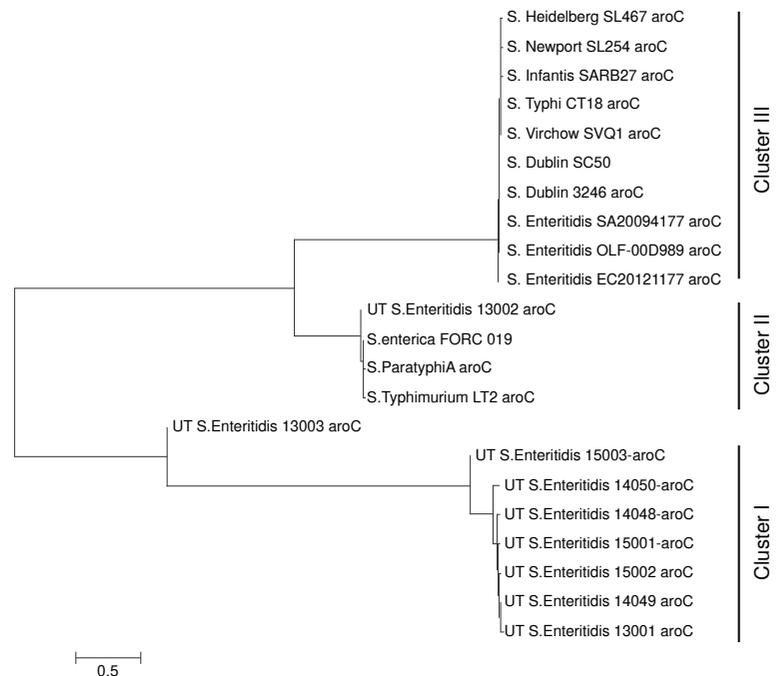


Figure 1. Phylogenetic tree of the chorismate synthase (*aroC*) gene from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from humans with gastroenteritis and poultry, and other reference strains. The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method based on the Tamura-Nei model (1). The tree with the highest log likelihood (-5805.4149) is shown drawn to scale with branch lengths measured in the number of substitutions per site. Nucleotide sequences from various *Salmonella* strains were aligned and the tree image was constructed by using the Molecular Evolutionary Genetic Analyses, MEGA6 (2).

The accession numbers are the following: *Salmonella enterica* strain FORC_019, CP012396.1; *S. Enteritidis* strain OLF-00D989 87-1, CP011942.1; *S. Enteritidis* str. SA20094177, CP007468.2; *S. Enteritidis* str. EC29121177, CP007333.2; *S. Heidelberg* str. SL476, CP001120.1; *S. Newport* str. SL254, NC_011080.1; *S. Infantis* str. SARB27, NZ_AFY100000000.1; *S. Typhi* str. CT18, AL513382.1; *S. Virchow* str. SVQ1, NZ_AZMP00000000.1; *S. Dublin* str. 3246, CM001151.1; *S. Paratyphi A*, CP000026.1; *S. Typhimurium* LT2, NC_003197.1. The human isolates obtained from clinical cases of gastroenteritis, laying hen farms, and egg shells from the wet market in the Tolima region are those coded UTS. Enteritidis 15001-15003, UTS. Enteritidis 13001-13003, and UTS. Enteritidis 14048-14050, respectively.

Despite differences in geographical distribution of isolates causing gastroenteritis in humans, to some extent our results are similar to those reported in Bangladesh where five different serovars were isolated from poultry and stool samples of human cases of gastroenteritis including *S. Paratyphi B* var Java ($n=16$), *S. Kentucky* ($n=7$), *S. Enteritidis* ($n=6$), *S. Virchow* ($n=4$), and *S. Weltevreden* ($n=1$), and one genotype of *S. Enteritidis* ST11 was indistinguishable from poultry and humans by PFGE and MLST (33).

Our results suggest that clinical cases of gastroenteritis in humans in Ibagué could be caused by a variety of *Salmonella* spp. serovars and that *S. Enteritidis* ST11, a common sequence type reported worldwide, and *S. Typhimurium* could have a predominant role as they were isolated from shell eggs and raw chicken meat, respectively (18,20).

In our previous studies we reported that *S. Enteritidis* was present in laying hen farms and in the surface of eggs, but not in chicken meat marketed in stores and supermarkets of Ibagué (20). Thus, in this study we compared

the predominant serovar of *Salmonella* in stool samples from gastroenteritis patients with poultry isolates. The serovars *S. Newport*, *S. Braenderup*, and *S. Typhimurium* found in stools from humans with gastroenteritis were commonly isolated from raw chicken carcasses marketed in this city (20). Nevertheless, *S. Uganda*, and *S. Gruposensis* were novel serovars identified in the Tolima region and perhaps in the country (*Ministerio de la Protección Social*, 2011). *Salmonella* Braenderup was previously identified from the liver of laying hens in Colombia by using DNA hybridization (34). Further studies are needed to assess the relationships between serovars causing gastroenteritis in humans and chicken meat sold in this city.

In spite of the lack of relatedness in space and time between *S. Enteritidis* isolates from laying hen farms (year-2013), commercial shell eggs (year-2014), and clinical isolates (year-2015), *S. Enteritidis* from each source shared the same allelic profile and, therefore, the ST. Additionally, all *S. Enteritidis* showed a common antibiotic susceptibility pattern to aminoglycosides and cephalosporins. The phylogenetic analyses using the *aroC* gene sequence supported this relationship and indicated that human and shell egg isolates of *S. Enteritidis* are indistinguishable and that they formed a single cluster that appeared to have evolved from a common ancestor present in laying hen farms (figure 1). Circulation and transmission of clones of *S. Enteritidis* with similar PFGE genomic profiles and limited diversity that were isolated from food of animal origin, retail stores or different sampling years were reported in Argentina (35). A lack of specific patterns that could be associated with the source or year of isolation was reported in *S. Enteritidis* isolated from food (n=61), chickens (n=60), and humans (n=67) during a 24-year period in Brazil using MLVA typing (36).

In the United States, intensive epidemiologic and laboratory investigations identified shell eggs as the major vehicle for *S. Enteritidis* infection in humans and established that internal contamination of eggs occurs by transovarian transmission of *S. Enteritidis* in the laying hen (8). *Salmonella* Enteritidis also appear to play a major role in egg contamination in the United Kingdom (37). Therefore, it was not unexpected to find a common genotype in poultry and human isolates in the Tolima region. In this sense, the evidence provided by this study may be useful to health care centers and public health authorities to increase the education on the risks created by *Salmonella* when poultry products are not properly manipulated or cooked before consumption.

The commercialization of dirty eggs in stores and supermarkets that can easily reach consumers' hands is indeed common in this city. The reason for this might be that laying hen farms predominantly use floor and conventional cage rearing systems in egg producing rather than furnished cages, which are more appropriate for egg production since the use of floor and conventional cages was found to be a risk factor for *S. Enteritidis* contamination of eggs (38). Furthermore, the results of this study may also point to a lack of appropriate cleaning and disinfection protocols for eggs before selling and the need for a more rigorous quality control and surveillance program for *Salmonella* in the Tolima region by poultry producers and health authorities, respectively.

In this study, *S. Enteritidis* ST11 was identified as the common sequence type circulating in laying hen farms, egg shell surfaces and stools from humans with gastroenteritis in Ibagué. *Salmonella* Enteritidis is known to cause human diseases with pandemic proportions (39). *Salmonella* Enteritidis ST11 was identified as a stable lineage and highly clonal ST isolated from humans (n=27), bovines (n=1), liquid eggs (n=1), and eggshells (n=1) in Japan (40) and from

clinical samples, beef, and pork in Korea (41). It is the most prevalent ST (44/46) isolated from clinical samples and poultry in Brazil (42,43) and the only ST common to human, poultry, and seabirds in Chile (44). In addition, ST11 was also reported in chicken meat (n=76) in Iran (45) and beef meat in Morocco (46) and it is the common ST harboring in the genome extended-spectrum β -lactamases (ESBL) such as CTX-M-14 and CTX-M15 that have been isolated from stool and blood samples of people in Korea (47). *Salmonella* Enteritidis ST11 also caused pyomyositis in humans (48) and omphalitis in chicks (49). Consequently, the data indicate that *S. Enteritidis* ST11 is the most common genotype circulating in poultry and causing non-typhoidal *Salmonella* in humans worldwide.

Despite the limited number of *S. Enteritidis* analyzed in this study and the low discriminatory power attributed to MLST when used to type isolates from the same serovar (50), MLST could discriminate three different ST from just 10 isolates in this study suggesting that, in spite of the disadvantages noted above, MLST might be useful to type small number of *S. Enteritidis* circulating in geographical regions with limited resources.

In conclusion, we found phenotypic and genetic relationships between *S. Enteritidis* isolated from human with gastroenteritis and poultry in the Tolima region for the first time. The data constitute a preliminary evidence of the risk of an inappropriate consumption and manipulation of eggs that might be responsible for the transmission of *S. Enteritidis* to humans. It is necessary to increase consciousness in poultry producers, manipulators, salespersons, and consumers about the risks that could be prevented through education and more appropriate and rigorous surveillance systems for this pathogen.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Luz Mari Calderón-Aratego for providing the clinical samples for *Salmonella* isolation.

References

1. Grimont PA, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Ninth edition. Paris, France: Institute Pasteur, WHO; 2007. p. 1-166.
2. Sanderson KE, Nair S. Taxonomy and species concepts in the genus *Salmonella*. In: Barrow PA, Methner U, editors. *Salmonella* in domestic animals. Wallingford: CABI; 2013. p. 1-19. <https://doi.org/10.1079/9781845939021.0001>
3. Landgridge GE, Wain J, Nair S. Invasive salmonellosis in humans. *EcoSal Plus*. 2012;5: 1-14. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.8.6.2.2>
4. Organización Mundial de Sanidad Animal. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres, 2017. Chapter 2.9.8. Salmonellosis. 2010. Accessed: January 22, 2017. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.09.08_SALMONELLOSIS.pdf
5. Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012. Atlanta, GA: U. S. Department of Health and Human Services, CDC; 2014. Accessed: January 22, 2017. Available from: https://www.cdc.gov/foodnet/PDFs/2012_annual_report_508c.pdf
6. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J*. 2016;14:4634-231. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634>
7. Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB, Wegener HC, *et al*. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: Results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis*. 2011;8:887-900. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0787>

8. Braden CR. *Salmonella* enterica serotype Enteritidis and eggs: A national epidemic in the United States. Clin Infect Dis. 2006;43:512-7. <https://doi.org/10.1086/505973>
9. Jackson BR, Griffin PM, Cole D, Walsh KA, Chai SJ. Outbreak-associated *Salmonella enterica* Serotypes and Food Commodities, United States, 1998-2008. Emerg Infect Dis. 2013;19:1239-44. <https://doi.org/10.3201/eid1908.121511>
10. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, *et al*. International Collaboration on Enteric Disease "Burden of Illness" Studies. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. Clin Infect Dis. 2010;50:882-9. <https://doi.org/10.1086/650733>
11. Dekker JP, Frank KM. *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia*. Clin Lab Med. 2015;35:225-46. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.002>
12. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, 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>
13. Public Health Agency of Canada. Public Health Notice-Outbreak of *Salmonella* infections under investigation. March 4, 2016. Accessed: January 22, 2017. Available from: <http://www.phac-aspc.gc.ca/phn-asp/2015/salmonella-infantis-eng.php>
14. Public Health England. Research and Analysis, *Salmonella* infections (fecal specimens) in England and Wales: Laboratory reports 2016. Accessed: January 25, 2017. Available from: <https://www.gov.uk/government/publications/salmonella-infections-faecal-specimens-in-england-and-wales-laboratory-reports-2016>
15. European Food Safety Authority. Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis infections associated with consumption of eggs from Germany. EFSA J. 2014;11:646E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2014.EN-646>
16. European Centre for Disease Prevention and Control. Communicable disease threats report 3-September, 2016. Accessed: January 22, 2017. Available from: www.ecdc.europa.eu
17. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico semana 21 de 2015. Dirección de Vigilancia y Análisis del riesgo en Salud Pública. 2015. Accessed: January 25, 2017. Available from: <http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2015%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2021.pdf>
18. Rodríguez R, Fandiño C, Donado P, Guzmán L, Verjan N. Characterization of *Salmonella* from commercial egg-laying hen farms in a central region of Colombia. Avian Dis. 2015;59:59-63. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05632.x>
19. Mogollón DC, Rodríguez VE, Verjan N. Prevalence and molecular identification of *Salmonella* isolated from commercialized eggs at Ibagué, Colombia. Rev Salud Anim. 2016;38:164-72.
20. Rodríguez J, Rondón I, Verjan N. Serotypes of *Salmonella* in broiler carcasses marketed at Ibagué, Colombia. Rev Bras Ciên Avic. 2015;17:545-52. <https://doi.org/10.1590/1516-635X1704545-552>
21. Donado-Godoy P, Gardner I, Byrne A, Leon M, Pérez-Gutiérrez E, Ovalle MV, *et al*. Prevalence, risk factors, and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* from commercial broiler farms in two important poultry-producing regions of Colombia. J Food Prot. 2012;75:874-83. <https://doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-458>
22. Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. Annu Rev Microbiol. 2006;60:561-88. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121325>
23. Pérez-Lozada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. Infect Genet Evol. 2013;16:38-53. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.009>
24. Thrusfield M. Veterinary epidemiology. Third edition. Ames, IO: Blackwell Publishing; 2007. p. 46-74.
25. Tindall BJ, Grimont PA, Garrity GM, Euzéby JP. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. Int J Syst Evol Microbiol. 2005;55:521-4. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63580-0>
26. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI publishes new antimicrobial susceptibility testing standards. Wayne: CLSI; 2014.
27. Sambrook J, Russell D. Molecular cloning: A laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor: Laboratory Press; 2001. p. 2100.
28. Rahn K, De Grandis A, Clarke R, McEwen A, Galán J, Ginocchio E, *et al*. Amplification of an *InvA* gene sequence of *Salmonella* typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol Cell Probes. 1992;6:271-9. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(92\)90002-F](https://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90002-F)

29. Achtman M, Wain J, Weill FX, Nair S, Zhou Z, Sangal V, *et al.* Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. PLoS Pathog. 2012;8:e1002776. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>
30. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput Biol. 2000;7:203-14. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>
31. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski 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>
32. Ministerio de la Protección Social. Perfil de riesgo *Salmonella* spp. (no tifoideas) en pollo entero y en piezas. Bogotá: Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos, UERIA; 2011.
33. Barua H, Biswas PK, Talukder KA, Olsen KE, Christensen JP. Poultry as a possible source of non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars in humans in Bangladesh. Vet Microbiol. 2014;168:372-80. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.11.020>
34. Pulido M, Sánchez R, Guard J, Do Nascimento V. Presence of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum in commercial laying hens diagnosed with fowl typhoid disease in Colombia. Avian Dis. 2014;58:165-70. <https://doi.org/10.1637/10598-062613-Case.1>
35. Favier GI, Lucero-Estrada CS, Lazarte-Otero V, Escudero ME. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization by PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of *Salmonella* spp. isolated from foods of animal origin in San Luis, Argentina. Food Control. 2013;29:49-54. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.056>
36. Campioni F, Davis M, Medeiros MI, Falcão JP, Shah DH. MLVA typing reveals higher genetic homogeneity among *S. Enteritidis* strains isolated from food, humans and chickens in Brazil in comparison to the North American Strains. Int J Food Microbiol. 2013;162:174-81. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.008>
37. Martelli F, Davies RH. *Salmonella* serovars isolated from table eggs: An overview. Food Res Int. 2012;45:745-54. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.054>
38. Howard ZR, O'Bryanb CA, Crandallb PG, Rickeb SC. *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. Food Res Int. 2012;45:755-64. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.030>
39. Rodrigue DC, Tauxe RV, Rowe B. International increase in *Salmonella* Enteritidis: A new pandemic? Epidemiol Infect. 1990;105:21-7.
40. Noda T, Murakami K, Asai T, Etoh Y, Ishihara T, Kuroki T, *et al.* Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis strains in Japan between 1973 and 2004. Acta Vet Scand. 2011;53:38. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-38>
41. Ji-Yeon H, Jung-Whan C, Jun-Ho P, Moo-Sang K, Young-Hee O, In-Soo C, *et al.* A comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enteric* serovar Enteritidis isolates obtained from food and human sources. Osong Public Health Res Perspect. 2013;4:27-33. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2012.12.005>
42. Campioni F, Pitondo-Silva A, Bergamini AM, Falcao JP. Comparison of four molecular methods to type *Salmonella* Enteritidis strains. APMIS. 2015;123:422-6. <https://doi.org/10.1111/apm.12367>
43. Milanez GP, Nascimento LC, Tirabassi AH, Zuanaze M, Rodrigues DP, Pereira GAG, *et al.* Whole-genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4, isolated from a Brazilian poultry farm. Genome Announc. 2016;4:e00340-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00340-16>
44. Retamal P, Fresno M, Dougnac C, Gutiérrez S, Gornall V, Vidal R, *et al.* Genetic and phenotypic evidence of the *Salmonella enterica* serotype Enteritidis human-animal interface in Chile. Front Microbiol. 2015;6:1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00464>
45. Ghaderi R, Tadayon K, Khaki P, Mosavari N. Iranian clonal population of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, characterized by multi-locus sequence typing (MLST) method. Iran J Microbiol. 2015;7:251-9.
46. Murgia M, Bouchrif B, Timinouni M, Al-Qahtani A, Al-Ahdal MN, Cappuccinelli P, *et al.* Antibiotic resistance determinants and genetic analysis of *Salmonella enterica* isolated from food in Morocco. Int J Food Microbiol. 2015;215:31-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.003>
47. Kim Y, Baea IK, Jeong SH, Leeb CH, Lee HK, Ahnd J, *et al.* Occurrence of IncFII plasmids carrying the blaCTX-M-15 gene in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis sequence type 11 in Korea. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;71:171-3. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.05.004>

48. Hwang JH, Shin GW, Lee CS. Community-onset pyomyositis caused by a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis sequence type 11 strain producing CTX-M-15 extended-spectrum - lactamase. J Clin Microbiol. 2015;53:1439-41. <https://doi.org/10.1128/JCM.03097-14>
49. Jones-Dias D, Clemente L, Egas C, Froufe H, Sampaio DA, Vieira L, *et al.* *Salmonella* enteritidis isolate harboring multiple efflux pumps and pathogenicity factors, shows absence of o antigen polymerase gene. Front Microbiol. 2016;7:1130. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01130>
50. Barco L, Barrucci F, Elmerdahl JO, Ricci A. *Salmonella* source attribution based on microbial subtyping. Int J Food Microbiol. 2013;163:193-203. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.005>

Artículo original

Infeción por *Clostridium difficile*: descripción de las cepas NAP1/027 y de otros serotipos en un centro de alta complejidad de Cali, Colombia, 2012-2015

José Millán Oñate-Gutiérrez^{1,2,3}, Janier Segura¹, Adriana Correa⁴, Erika Cantor⁵, María Virginia Villegas¹

¹ Servicio de Medicina Interna, Centro Médico Imbanaco, Cali, Colombia

² Resistencia bacteriana, CIDEIM, Cali, Colombia

³ Departamento de Medicina Interna, Escuela de Medicina, Universidad del Valle, Cali, Colombia

⁴ Servicio de Dermatología, Centro Médico Imbanaco, Cali, Colombia

⁵ Instituto de Investigación, Centro Médico Imbanaco, Cali, Colombia

Introducción. *Clostridium difficile* ocasiona infecciones hospitalarias que resultan en altas tasas de morbilidad y mortalidad. La cepa NAP1/027 se ha asociado con una mayor producción de toxinas y con una mayor gravedad, lo que aumenta la carga de la enfermedad. **Objetivo.** Describir la epidemiología de las infecciones asociadas con *C. difficile* y las características de la cepa NAP1/027.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio observacional basado en la revisión de las historias clínicas de los pacientes con muestras de heces positivas para *C. difficile* identificadas mediante la prueba Xpert™ entre el 2012 y el 2015 en un hospital de alta complejidad. La gravedad de la enfermedad se evaluó con el índice ATLAS.

Resultados. Se incluyeron 42 casos de pacientes infectados, 9 de los cuales fueron positivos para la cepa NAP1/027. El uso de antibióticos antes de la infección durante más de siete días fue más frecuente en los casos de pacientes con muestras negativas para NAP1/027. En la mitad de los pacientes, la duración de la diarrea fue mayor de cinco días y no hubo diferencias según el tipo de cepa ($p>0,05$). Los casos de pacientes positivos para la cepa NAP1/027 se caracterizaron por presentar deposiciones fétidas y sanguinolentas. La gravedad de la infección fue similar entre los grupos.

Conclusión. Se comprobó la circulación de la cepa NAP1/027, pero su presencia no supuso diferencias clínicas significativas con respecto a otras cepas, lo cual podría deberse al limitado número de pacientes en este estudio. Sin embargo, su presencia debe alertar a los médicos y a las instituciones de salud, dada su frecuente asociación con la gravedad de la infección y la mortalidad.

Palabras clave: *Clostridium difficile*; diarrea; antibacterianos; infecciones bacterianas/epidemiología; enterocolitis pseudomembranosa.

***Clostridium difficile* infection: Description of NAP1/027 and non NAP1/027 strains in a high complexity center in Cali, Colombia, 2012-2015**

Introduction: *Clostridium difficile* causes nosocomial infections leading to high morbidity and mortality. The NAP1/027 strain is associated with a higher toxin production and disease severity, which increases the load of the disease.

Objective: To describe the epidemiology of the infections associated with *C. difficile* and the characteristics related to the NAP1/027 strain.

Materials and methods: This was an observational study based on the revision of clinical registries of patients with fecal samples that were positive for *C. difficile* identified by the Xpert test™ between 2012 and 2015 in a high complexity institution. The severity of the disease was evaluated by means of the ATLAS score.

Results: We included 42 infected cases, 9 of which were positive for the NAP1/027 strain. The use of antibiotics previous to the infection for more than seven days was more frequent in patients with negative results for NAP1/027. The duration of diarrhea in half of the patients was longer than five days and there were no differences according to the type of strain ($p>0.05$). Positive cases for the NAP1/027 strain were characterized by presenting fetid and bloody stools. The severity of the infection was similar between the groups.

Conclusions: In Colombia, the NAP1/027 strain circulates without significant clinical differences, which could be due to the limited number of patients. Nevertheless, the existence of NAP1/027 should alert physicians and health institutions because of its high association with severity and mortality.

Keywords: *Clostridium difficile*; diarrhea; anti-bacterial agents; bacterial infections/epidemiology; enterocolitis, pseudomembranous.

Recibido: 30/06/17
Aceptado: 22/08/18
Publicado: 27/08/18

Citación:

Oñate-Gutiérrez JM, Segura J, Correa A, Cantor E, Villegas MV. Infeción por *Clostridium difficile*: descripción de las cepas NAP1/027 y de otros serotipos en un centro de alta complejidad de Cali, Colombia, 2012-2015. Biomédica. 2019;39(Supl.1):63-70
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.3950>

Correspondencia:

José Millán Oñate-Gutiérrez, Servicio de Medicina Interna, Centro Médico Imbanaco, Calle 5C N° 39-33, primer piso, Cali, Colombia
Teléfono: (572) 682 1000, extensión 14091; fax: (572) 514 6015
jose.onate@imbanaco.com.co y millanonate@gmail.com

Contribución de los autores:

Jose Millán Oñate-Gutiérrez: participación en todas las etapas del estudio
Erika Cantor: creación y análisis de la base de datos
Janier Segura y María Virginia Villegas: recolección de los datos
Todos los autores participaron en el diseño del estudio, la revisión de la literatura y la redacción del manuscrito.

Financiación:

No se requirió financiación para el presente estudio, el cual se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Médico Imbanaco de Cali, S.A.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Clostridium difficile es un microorganismo de creciente relevancia que actualmente se considera el agente causal más importante de las infecciones hospitalarias en los Estados Unidos (1). El espectro de las infecciones ocasionadas por *C. difficile* incluye desde las asintomáticas hasta aquellas con megacolon tóxico y colitis fulminante, complicaciones presentes en 3 a 8 % de los pacientes infectados (2-5). Estas infecciones se asocian con un incremento de los costos de hospitalización, así como con recurrencia y aumento de la mortalidad (4-6).

Recientemente, se reportó la aparición de nuevos serotipos de *C. difficile* y de una cepa hipervirulenta, la NAP1/027 (*North American PFGE type 1/ribotype 027*), que se asocia con una mayor producción de toxinas y, por consiguiente, con una mayor gravedad de las manifestaciones clínicas (7-9)

En Colombia, ya se ha informado de la presencia de esta cepa hipervirulenta (10,11), pero hay pocos datos sobre la epidemiología hospitalaria y el papel del agente patógeno en los hospitales. Varios autores han descrito factores asociados con la presencia de *C. difficile* en el país (10-13) y, previamente, se había informado sobre una prevalencia de 10 casos por cada 10.000 pacientes por año en el Centro Médico Imbanaco (10).

Los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) recomiendan que los hospitales y clínicas deben incluir el diagnóstico de *C. difficile* en la evaluación de los casos indicativos de esta infección, además de establecer políticas de vigilancia local y de detección de los factores de riesgo asociados con esta infección y con su gravedad (14).

En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue describir la epidemiología de las infecciones asociadas con *C. difficile* en un hospital de alta complejidad, así como la presentación clínica observada, la gravedad de los casos y las características relacionadas con la presencia de la cepa NAP1/027.

Materiales y métodos

Diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio observacional basado en la revisión de las historias clínicas de los pacientes con muestras de heces positivas para *C. difficile* entre el 2012 y el 2015 en un hospital de alta complejidad. Para su identificación, se utilizó la prueba Xpert *C. difficile*TM (Cepheid, Sunnyvale, CA, EE. UU.) y su sistema GeneXpertTM. Esta técnica permite la detección de los genes de *C. difficile* con una sensibilidad mayor del 90 % y, además, identifica el ribotipo responsable de la infección.

Se definió como caso de diarrea asociada con *C. difficile* el de aquellos pacientes con deposiciones diarreicas y un resultado positivo en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para este microorganismo. La recurrencia se definió como la presencia de dos episodios de diarrea en un tiempo no mayor de ocho semanas. El caso adquirido en la comunidad se definió como el de aquellos pacientes que no presentaban antecedentes de hospitalización en el último mes antes de que presentaran alguna sintomatología.

Muestra de estudio

Durante el período del estudio, se encontraron 48 muestras de heces positivas para *C. difficile*. En el análisis se excluyeron 6 casos en cuyas historias clínicas institucionales no se informaba la presencia de la infección.

Con el sistema GeneXpert™, se determinó la presencia de *C. difficile* y del ribotipo 027. Los 42 pacientes restantes se clasificaron en dos grupos según la presencia o la ausencia del ribotipo NAP1/027, y se hicieron comparaciones entre ellos.

Recolección de la información

Se revisaron las historias clínicas de cada paciente y se recolectó la información de la presencia de comorbilidades (diabetes mellitus, enfermedad hematológica-oncológica, insuficiencia renal crónica, enfermedad cardiopulmonar o trasplantes, entre otras). Asimismo, se analizaron los signos vitales al iniciarse los síntomas y se registraron los valores de los leucocitos, la creatinina y la proteína C reactiva en el momento del diagnóstico. Además, se analizaron la duración de la administración y el tipo de antibióticos utilizados antes del inicio de la diarrea, y se caracterizaron las deposiciones descritas por los pacientes.

La gravedad de la enfermedad se calificó con el puntaje ATLAS (*Antimicrobial Testing Leadership And Surveillance*) (15,16)

Análisis estadístico

La información se analizó con el programa estadístico Stata 13.0™. La descripción de las características de los casos positivos o negativos para la cepa NAP1/027, se hizo con estadísticas de tendencia central (media, mediana) y de dispersión (desviación estándar y rango intercuartílico) en el caso de las variables continuas, y con distribuciones de frecuencias relativas y absolutas para las variables categóricas.

En la comparación de las variables categóricas entre los casos positivos y negativos para la cepa NAP1/0.27, se utilizó la prueba de ji al cuadrado, o prueba de Fisher, y para las cualitativas, la prueba t de Student o la U de Mann-Whitney, según los criterios de normalidad. El nivel de significación se fijó en 0,05.

Consideraciones éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Centro Médico Imbanaco.

Resultados

Durante el período de estudio, se encontraron 42 casos de infección por *C. difficile* en las historias clínicas del Centro. En 9 (21,4 %) de las muestras positivas para *C. difficile*, se identificó la cepa NAP1/027 mediante PCR.

En el cuadro 1, se presentan las características generales y clínicas de los pacientes. Al comparar los dos grupos con cepas de *C. difficile*, con presencia o ausencia del ribotipo NAP1/027, no se observaron diferencias en la edad; la mitad de los casos de *C. difficile* se presentó en adultos mayores de 53 años, así como en pacientes con leucemia o falla renal, y en aquellos bajo tratamiento por otras infecciones. Ocho (19,0 %) de los casos positivos para *C. difficile* provenían de la comunidad y, de estos, tres eran positivos para la cepa NAP1/027, es decir, casi la tercera parte.

La administración de antibióticos por más de siete días antes de la infección fue más frecuente entre los casos por cepas sin el serotipo NAP1/027 ($p < 0,05$), con una mediana de 11 días (RIQ=8-16), en comparación

con la mediana de 7 días (RIQ=6-11) en aquellos con *C. difficile* de serotipo NAP1/027. Los carbapenémicos fueron los antibióticos más utilizados antes del inicio de la diarrea, y se emplearon únicamente en los casos positivos para *C. difficile*, mas no para aquellos con la cepa NAP1/027. Los antiácidos (inhibidores de la bomba de protones) se utilizaron en siete de cada diez casos positivos para *C. difficile*, con una proporción similar entre los infectados con la cepa NAP1/027 y aquellos con otros serotipos (cuadro 1).

Cuadro 1. Características generales de los pacientes

Variables	Universo (N=42)	Positivos para NAP1/027 (n=9)	Negativos para NAP1/027 (n=33)	P
Edad (años) [mediana (RIC)]	53,0 (22,5-64,0)	48,0 (20,5-59,5)	55,0 (21,0-67,5)	0,589
Sexo [n (%)]				
Masculino	15 (35,7)	2 (22,2)	13 (39,4)	0,451
Femenino	27 (64,3)	7 (77,8)	20 (60,6)	
Signos vitales				
Presión arterial sistólica (mm Hg) [media ± DE]	115,6 ± 17,1	113,0 ± 12,5	116,6 ± 18,3	0,607
Presión arterial diastólica (mm Hg) [media ± DE]	67,8 ± 11,3	67,6 ± 11,8	67,6 ± 11,3	0,781
Frecuencia cardiaca (latidos por minuto) [mediana (RIC)]	90,0 (83,5-108,2)	92,0 (85,5-107,5)	90,0 (81,5-112,5)	0,747
Temperatura (°C) [mediana (RIC)]	36,5 (36,1-37,3)	36,5 (36,1-37,1)	36,5 (36,0-37,4)	0,154
Exámenes de laboratorio				
Leucocitos (células/ml) [mediana (RIC)]	10,3 (3,1-15,8)	11,5 (9,2-25,9)	10,1 (2,3-15,6)	0,154
Creatinina (mg/dl) [mediana (RIC)]	0,66 (0,48-1,31)	0,58 (0,52-1,07)	0,67 (0,45-1,41)	0,276
PCR [mediana (RIC)]	66,7 (23,5-145,7)	75,6 (23,6-156,2)	37,2 (12,4-95,2)	0,473
Diagnósticos [n (%)]				
Anemia	4 (9,5)	2 (22,2)	2 (6,1)	0,196
Falla renal	9 (21,4)	2 (22,2)	7 (21,2)	0,999
Leucemias	11 (26,2)	2 (22,2)	9 (27,3)	0,999
Infección urinaria	10 (23,8)	1 (11,1)	9 (27,3)	0,416
Otra infección	10 (23,8)	4 (44,1)	6 (18,2)	0,181
Cáncer	8 (19,0)	2 (22,2)	6 (18,2)	0,999
Hipotiroidismo	4 (9,5)	3 (33,3)	1 (3,0)	0,026
Enfermedad coronaria	6 (14,3)	2 (22,2)	4 (12,1)	0,593
Hipertensión arterial sistémica	9 (21,4)	1 (11,1)	8 (24,2)	0,655
Diabetes	6 (14,3)	0 (0,0)	6 (18,2)	0,312
Cirugías previas				
Sí	23 (54,8)	4 (44,4)	19 (57,6)	0,707
No	19 (45,2)	5 (55,6)	14 (42,4)	
Antibióticos previos [n (%)]				
Sí	40 (95,2)	9 (100,0)	31 (93,9)	0,999
Duración de los antibióticos (días) [n (%)]				
≤7	10 (25,6)	5 (55,6)	5 (16,7)	0,032
>7	29 (74,4)	4 (44,4)	28 (83,3)	
Tipo de antibiótico [n (%)]				
Linezolid	3 (7,7)	0 (0,0)	3 (10,0)	0,999
Clindamicina	3 (7,7)	1 (11,1)	2 (6,7)	0,556
Cefepime	9 (23,1)	1 (11,1)	8 (26,7)	0,654
Fluoroquinolona	9 (23,1)	2 (22,2)	7 (23,3)	0,999
Clindamicina	3 (7,7)	1 (11,1)	2 (6,7)	0,556
Vancomicina	6 (15,4)	1 (11,1)	5 (16,7)	0,999
Cefalosporina, 1 g	1 (2,6)	1 (11,1)	0 (0,0)	0,231
Cefalosporina, 2 g	3 (7,7)	1 (11,1)	2 (6,7)	0,556
Cefalosporina, 3 g	3 (7,7)	2 (22,2)	1 (3,3)	0,127
Carbapenémicos	11 (28,2)	0 (0,0)	11 (36,7)	0,040
Penicilinas	5 (12,8)	1 (11,1)	4 (13,3)	0,999
Penicilina inhibidores de la betalactamasa	8 (20,5)	3 (33,3)	5 (16,7)	0,355
Antiácidos [n (%)]				
Sí	31 (73,8)	7 (77,8)	24 (72,7)	0,999

RIC: rango intercuartílico; DE: desviación estándar

En la mitad de los pacientes, la diarrea persistió durante más de cinco días, sin diferencias en cuanto al tipo de cepa ($p>0,05$). Los pacientes con infección por la cepa de serotipo NAP1/027, se caracterizaron por presentar deposiciones fétidas (77,8 %) y sanguinolentas (44,4 %), en comparación con aquellos con otros serotipos, en los cuales dichas proporciones fueron de 30,3 y 15,1 %, respectivamente

La gravedad de la infección fue similar entre los casos con la cepa NAP1/027 y aquellos con *C. difficile* de otros serotipos. La tercera parte de las infecciones por *C. difficile* se consideraron graves según el puntaje ATLAS (15,16). En un caso negativo para la cepa NAP1/027, fue necesario hacer una hemicolectomía para controlar la infección. Siete (16,7 %) de los pacientes fallecieron durante la estancia hospitalaria. Tres (7,1 %) de las muertes se atribuyeron a la infección por *C. difficile*, pero ninguna cepa era del serotipo NAP1/027 en estos casos (cuadro 2).

Cuadro 2. Características de la deposición y gravedad de la enfermedad

Variables	Universo (N=42)		Positivos para NAP1/027 (n=9)		Negativos para NAP1/027 (n=33)		p
Diarrea (días) [mediana (RIC)]	5	(3-9)	4	(1-8)	5	(3-9)	0,516
Heces							
Fétidas	17	(40,5)	7	(77,8)	10	(30,3)	0,019
Sanguinolentas	9	(21,4)	4	(44,4)	5	(15,1)	0,080
Con moco	7	(16,7)	1	(11,1)	6	(18,2)	0,999
Calificación según ATLAS							
Leve	26	(61,9)	6	(66,7)	20	(60,6)	0,999
Grave	16	(38,1)	3	(33,3)	13	(39,4)	
Recidiva							
Sí	2	(4,8)	1	(11,1)	1	(3,0)	0,387
Complicaciones							
Sepsis	5	(11,9)	0	(0,0)	5	(15,1)	0,567
Muerte	3	(7,1)	0	(0,0)	3	(9,1)	0,999
Muerte por cualquier causa	7	(16,7)	0	(0,0)	7	(21,2)	0,314
Estancia en UCI [n (%)]							
Sí	14	(33,3)	2	(22,2)	12	(36,4)	0,692
Estancia hospitalaria (días) [mediana (RIC)]	18,5	(6,0-41,0)	7,0	(4,0-93,0)	21,0	(7,0-41,0)	0,373

RIC: rango intercuartílico; UCI: unidad de cuidados intensivos

Catorce (33,3 %) de los 42 pacientes con infección por *C. difficile* requirieron hospitalización en la unidad de cuidados intensivos, sin diferencias según el tipo de cepa. En dos de infectados con la cepa de serotipo NAP1/027, el tratamiento se cambió posteriormente a vancomicina. Por otra parte, solo un caso negativo para esta cepa requirió este medicamento. La infección fue recurrente en dos (4,8 %) de los 42 pacientes positivos para *C. difficile*, uno de ellos con el serotipo NAP1/027 y que había recibido ampicilina sulbactam como profiláctico antes de una colecistectomía; el otro fue negativo para la cepa NAP1/027 y recibió tratamiento con vancomicina por infección en una prótesis de rodilla (cuadro 2).

Discusión

Clostridium difficile es el principal agente patógeno responsable de infecciones hospitalarias en los Estados Unidos (1). La morbimortalidad asociada con este germen se ha incrementado en los últimos años, probablemente por la aparición de una cepa extremadamente virulenta (7). Sin embargo, algunos

autores han planteado que la mortalidad asociada con *C. difficile* depende del estado clínico y de la inmunosupresión del paciente (4,5). En este estudio, la mortalidad asociada con *C. difficile* fue del 7,1 %, comparable con las registradas en otras series de casos con tasas entre el 6 y el 10 % (6,8).

Los antibióticos carbapenémicos se emplearon únicamente en los casos negativos para la cepa hipervirulenta, hallazgo que debe constatar en estudios con un número mayor de pacientes y en diferentes centros para establecer su causalidad. En el presente estudio, debe tenerse en cuenta que la mayoría de los pacientes que recibieron carbapenémicos estaban hospitalizados y que, en el hospital de estudio, entre las cepas circulantes no predominan las virulentas.

El puntaje del ATLAS es una herramienta clínica validada para diferenciar entre los casos graves, y los leves o moderados (15,16). En ella, se utilizan variables clínicas y solo un indicador de laboratorio, la albúmina, para diferenciarlos según la presentación clínica inicial. Es importante establecer la gravedad del paciente en el momento del diagnóstico, para administrar un tratamiento antimicrobiano adecuado que, en los casos graves, se recomienda sea con vancomicina oral o con fidaxomicina (14). Solo 16 (38 %) de los 42 pacientes se calificaron como graves en el momento del diagnóstico y no hubo diferencias entre los dos grupos (con ausencia o presencia del serotipo NAP1/027), según la gravedad inicial, la permanencia en la unidad de cuidados intensivos o los días de hospitalización, lo que coincide con otros estudios en los que no se ha observado una mayor virulencia en los infectados por la cepa NAP1/027 (4).

Por otra parte, el porcentaje de pacientes con infecciones originadas en la comunidad fue de 19 %, hallazgo que concuerda con lo reportado previamente en la ciudad (10). Esto plantea la necesidad de una política de uso regulado de los medicamentos antimicrobianos en el ámbito ambulatorio y de restricción de la venta de antibióticos sin fórmula médica.

La mayoría de los pacientes recibió tratamiento con metronidazol, y las tasas de mortalidad y recurrencia no se asociaron con el antibiótico empleado. Sin embargo, el uso de metronidazol se ha asociado con recurrencias, especialmente en aquellos casos cuya presentación clínica inicial fue grave (17), diferencias que pueden atribuirse al tamaño de la muestra, por lo que se requiere un estudio con mayor número de casos, preferentemente multicéntrico, para corroborar estos hallazgos.

La tasa de recurrencias fue del 4,8 %, inferior a lo reportado previamente en otros estudios (4) y aunque dicha tasa fue baja, se asoció con el uso continuado de antibióticos para controlar otras infecciones, lo que aumenta el daño colateral sobre la microbiota y favorece la reaparición de *C. difficile*. Solo un paciente requirió hemicolecotomía para controlar su infección; en este sentido, debe considerarse el uso de otras opciones terapéuticas para este tipo de situaciones de difícil tratamiento y control, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales, la fidaxomicina (18) o la tigeciclina intravenosa (19).

Dado que este estudio se hizo en un solo hospital, no es posible extrapolar los datos a nivel nacional, aunque sus resultados ponen de manifiesto la necesidad de hacer un estudio nacional multicéntrico para evaluar el impacto de la cepa NAP1/027. Los pocos casos positivos para la cepa NAP1/027 constituyen un punto de partida para determinar posibles factores relacionados con la aparición de esta nueva cepa.

Es importante conocer la realidad epidemiológica de *C. difficile* en el país, con el fin de adoptar medidas que limiten su diseminación en los hospitales, y favorezcan el diagnóstico y el tratamiento temprano y efectivo.

Agradecimientos

Al Servicio de Laboratorio y al Instituto de Investigación del Centro Médico Imbanaco por su apoyo durante la realización de este proyecto.

Referencias

1. Maggil S, Edwards J, Stat M, Bamberg W, Beldavs Z, Dumyati G, *et al.* Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med.* 2014;370:1198-208. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306801>
2. Leffler D, Lamont T. *Clostridium difficile* infections. *N Engl J Med.* 2015;372:1539-48. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1403772>
3. Zea JW, Salazar CL. Enfermedad asociada a *Clostridium difficile*: prevalencia y diagnóstico por laboratorio. *Infectio.* 2012;16:211-22. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(12\)70016-4](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70016-4)
4. Depestel DD, Aronoff DM. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection. *J Pharm Pract.* 2013;26:464-75. <https://doi.org/10.1177/0897190013499521>
5. Rodríguez-Pardo D, Almirante B, Bartolome RM, Pomar V, Mirelis B, Navarro F, *et al.* Epidemiology of *Clostridium difficile* infection and risk factors for unfavorable clinical outcomes: Results of a hospital-based study in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1465-73. <https://doi.org/10.1128/JCM.03352-12>
6. Magee G, Strauss ME, Thomas SM, Brown H, Baumer D, Broderick KC. Impact of *Clostridium difficile*-associated diarrhea on acute care length of stay, hospital costs, and readmission: A multicenter retrospective study of inpatients, 2009-2011. *Am J Infect Control.* 2015;43:1148-53. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.06.004>
7. See I, Mu Y, Cohen J, Beldavs ZG, Winston LG, Dumyati G, *et al.* NAP1 strain type predicts outcomes from *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis.* 2014;58:1394-400. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu125>
8. Morfin-Otero R, Garza-González E, Aguirre-Díaz SA, Escobedo-Sánchez R, Esparza-Ahumada S, Pérez-Gómez HR, *et al.* *Clostridium difficile* outbreak caused by NAP1/BI/027 strain and non-027 strains in a Mexican hospital. *Braz J Infect Dis.* 2016;20:8-13. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.09.008>
9. Marsh JW, Arora R, Schlackman JL, Shutt KA, Curry SR, Harrison LH. Association of relapse of *Clostridium difficile* disease with BI/NAP1/027. *J Clin Microbiol.* 2012;50:4078-82. <https://doi.org/10.1128/JCM.02291-12>
10. Oñate-Gutiérrez J, Villegas M, Correa A. Prevalencia y factores relacionados con la infección por *Clostridium difficile* en un centro hospitalario de alta complejidad en Cali (Colombia). *Infectio.* 2017;21:9-14. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2015.12.002>
11. Gualtero S, Abril LA, Camelo N, Sánchez SD, Silva E, Dávila FA, *et al.* Características de la infección por *Clostridium difficile* en una institución de alta complejidad y reporte de la circulación en Colombia de la cepa hipervirulenta NAP17027. *Biomédica.* 2017;37:7-12. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i4.3244>
12. Otero-Regino W, González A, Gómez-Zuleta M. Prevalencia de diferentes tipos de colitis en personas adultas mayores. *Revista Colombiana de Gastroenterología.* 2009;24:272-8.
13. Becerra MG, Ospina S, Atehortúa SL, Berbesi DY. Factores de riesgo para la infección por *Clostridium difficile*. *Infectio.* 2011;15:220-6.
14. Cohen S, Gerding D, Johnson S, Kelly C, Loo V, McDonald L, *et al.* Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010;31:431-55. <https://doi.org/10.1086/651706>
15. Hernández-García R, Garza-González E, Miller M, Arteaga-Muller G, Galván-de los Santos AM, Camacho-Ortiz A. Application of the ATLAS score for evaluating the severity of *Clostridium difficile* infection in teaching hospitals in México. *Braz J Infect Dis.* 2015;19:399-402. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.05.005>

16. Miller MA, Louie T, Mullane K, Weiss K, Lentnek A, Golan Y, *et al.* Derivation and validation of a simple clinical bedside score (ATLAS) for *Clostridium difficile* infection which predicts response to therapy. BMC Infect Dis. 2013;13:148. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-148>
17. Di X, Bai N, Zhang X, Liu B, Ni W, Wang J, *et al.* A meta-analysis of metronidazole and vancomycin for the treatment of *Clostridium difficile* Infection, stratified by disease severity. Braz J Infect Dis. 2015;19:339-49. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.03.006>
18. Debast S, Bauer M, Kuijper E. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect. 2014;20(Suppl.2):1-26. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12418>
19. Mathur H, Rea MC, Cotter PD, Ross RP, Hill C. The potential for emerging therapeutic options for *Clostridium difficile* infection. Gut Microbes. 2014;5:696-710. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.983768>

Artículo original

Genotipificación de aislamientos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante MIRU-VNTR, Cali, Colombia, 2013-2015

David Felipe García, Myriam Astudillo

Departamento de Microbiología, Universidad del Valle, Cali, Colombia

Introducción. La tuberculosis continúa siendo uno de los problemas de salud más importantes a nivel mundial y, con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), constituye la principal causa de muerte por infecciones. En el 2016, se notificaron 6,3 millones de casos nuevos de la enfermedad.

Objetivo. Describir los patrones genéticos determinados mediante la genotipificación del número variable de repeticiones en tándem de unidades repetitivas interesparadas de micobacterias (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of Tandem Repeats*, MIRU-VNTR) en la población de estudio y compararlos con los hallados en otros estudios locales e internacionales.

Materiales y métodos. Mediante MIRU-VNTR, entre el 2013 y el 2015 se hizo la genotipificación de 105 muestras de ADN extraídas del esputo o de aislamientos en cultivo de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes residentes en Cali con diagnóstico de tuberculosis pulmonar. La amplificación de 24 loci MIRU-VNTR se hizo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los amplicones resultantes se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa (2 %) teñidos con SYBR Safe™. La asignación de los alelos se hizo con un análisis gráfico con el programa GelAnalyzer 2010. Los resultados obtenidos se analizaron con el algoritmo UPGMA y se compararon con las bases de datos internacionales MIRU-VNTRplus y SITVITWEB.

Resultados. Se genotipificaron por completo 62 de las muestras y se obtuvieron 58 perfiles diferentes de MIRU-VNTR. Al comparar con las bases de datos internacionales, su distribución por linajes fue la siguiente: 54,8 % para el LAM, 25,8 % para el Haarlem, 14,5 % para el S, 3,2 % para el Beijing y 1,6 % para el Cameroon. Los patrones MIRU-VNTR correspondieron a 20 tipos internacionales de MIRU (*MIRU International Types*, MIT) diferentes, y los más frecuentes fueron el MIT 190 y el MIT 110, con 22,6 y 6,5 %, respectivamente.

Conclusión. Estos resultados confirmaron hallazgos previos sobre el predominio de los linajes LAM y Haarlem en la ciudad y la presencia de los MIT encontrados en otra ciudad de Colombia.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis pulmonar; repeticiones de minisatélite.

MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in a population of patients in Cali, Colombia, 2013-2015

Introduction: Tuberculosis continues to be one of the main public health problems in the world. Together with the HIV infection, it is one of the main causes of death due to infections worldwide. In 2016, 6.3 million new cases of the disease were reported.

Objective: To describe the genetic patterns determined by genotyping using variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU-VNTR) in the study population and compare them with other studies carried out in Cali, Colombia, and the world.

Materials and methods: We genotyped a total of 105 DNA samples extracted from sputum or culture isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, which were obtained from pulmonary tuberculosis diagnosed patients over the period 2013-2015, in Cali. We performed PCR amplification of 24 loci by MIRU-VNTR on the DNA extracted from the samples. The amplicons were visualized in agarose gel electrophoresis (2%) with SYBR Safe™ staining. Then, the alleles were designated by graphical analysis using the GelAnalyzer 2010 software. These results were analyzed using the UPGMA algorithm and compared with the registers from the MIRU-VNTR plus and SITVITWEB databases.

Results: We genotyped 62 of the samples completely and we obtained 58 different MIRU-VNTR profiles. By comparing with the international databases, we determined the following distributions per lineage: LAM, 54.8%; Haarlem, 25.8%; S, 14.5%; Beijing, 3.2%, and Cameroon, 1.6%. The MIRU-VNTR patterns corresponded to 17 different MITs; the most frequent were MIT 190 and MIT 110, with 22.6% and 6.5%, respectively.

Conclusions: These results demonstrated previous observations about the predominance of the LAM and Haarlem lineages in the city, and the presence of the MITs found in another city of Colombia.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis, pulmonary; minisatellite repeats.

Recibido: 08/08/17
Aceptado: 27/08/18
Publicado: 30/08/18

Citación:

García D, Astudillo M. Genotipificación de aislamientos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante MIRU-VNTR, Cali, Colombia, 2013-2015. Biomédica. 2018;39(Supl.1):71-85 <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.3924>

Correspondencia:

Myriam Astudillo, Departamento de Microbiología, Universidad del Valle, Avenida 1N N° 3N-35, Cali, Colombia
Teléfono: (572) 667 0327
myriam.astudillo@correounivalle.edu.co

Contribución de los autores:

David Felipe García: desarrollo de los procedimientos experimentales, compilación de los resultados
Ambos autores participaron en el análisis y discusión de los resultados, y en la escritura del manuscrito.

Financiación:

El estudio fue financiado por el Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

La tuberculosis continúa siendo uno de los problemas de salud más importantes en el mundo y, con la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), constituye una de las principales causas de muerte por infecciones. En el 2016, se notificaron 6,3 millones de casos nuevos de la enfermedad (1).

Según la Organización Mundial de la Salud, la tuberculosis multirresistente se define como aquella resistente a los dos fármacos antituberculosos más potentes (isoniacida y rifampicina). Por otra parte, la tuberculosis 'ultrarresistente' lo es también a cualquier fluoroquinolona (como la levofloxacina o la moxifloxacina) y, por lo menos, a uno de los tres fármacos antituberculosos inyectables de segunda línea (amikacina, capreomicina o kanamicina) (2).

La creciente resistencia a los medicamentos antituberculosos en algunos países, y la relación existente entre las precarias condiciones de vida y de trabajo y la presencia del HIV en la población afectada, entre otros factores, han dificultado el control efectivo de esta enfermedad (3). La amenaza mundial de la tuberculosis ha servido de acicate para el despliegue de un esfuerzo global en la búsqueda de métodos eficaces para su vigilancia epidemiológica orientados al control y la disminución de su incidencia, el diagnóstico oportuno y el tratamiento adecuado de los casos ya notificados.

En el 2017, se notificaron al Sistema de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) de Colombia 14.480 casos de tuberculosis en todas sus formas, con una tasa de incidencia de 26,3 casos por 100.000 habitantes (4), pero con diferencias significativas entre los territorios, pues en algunos esta duplica el promedio nacional, lo cual refleja, a su vez, diferencias en las medidas de control y de vigilancia, así como en las dinámicas de transmisión.

El Valle del Cauca es uno de los departamentos con mayor número de casos notificados a nivel nacional. En el 2015, se notificaron cerca de 1.552 casos de tuberculosis pulmonar, con una incidencia de 29,8 casos por 100.000 habitantes (5). Cali se considera una ciudad con alto riesgo de tuberculosis dado que la incidencia es mayor a la observada en el territorio nacional. En el 2016, se encontró una incidencia de la forma pulmonar de 34 por 100.000 habitantes (6), con tendencia a aumentar, lo que constituye un complejo panorama para su control. A ello se suma el alto porcentaje de abandono del tratamiento (15 %) y los casos de infección concomitante de tuberculosis y HIV (16 a 18 %) (5).

En este contexto, la tipificación molecular de los aislamientos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* se acepta cada vez más como una herramienta útil que facilita el conocimiento de la epidemiología de la tuberculosis (7), y su prevención y control. La información que dicho análisis brinda ha contribuido a la comprensión de la dinámica de la transmisión y la patogenia de la enfermedad (8-10), y ha permitido establecer los probables factores de riesgo de la transmisión reciente y su alcance en una población, así como detectar la transmisión cuando no se ha sospechado tempranamente e identificar cepas resistentes a los medicamentos, confirmar la contaminación cruzada en el laboratorio, determinar los resultados falsos positivos en los cultivos y distinguir entre casos de reinfección o recaídas (11-13).

Se han desarrollado numerosos métodos para la genotipificación de cepas del complejo *M. tuberculosis* y para describir su estructura poblacional. La técnica desarrollada por van Embden (14), basada en el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y la detección de la variabilidad en la presencia y posición de la secuencia de inserción IS6110

(RFLP-IS6110), era la técnica estándar para la tipificación de las micobacterias (15). Sin embargo, el tiempo y la laboriosidad que exigía impulsaron el desarrollo de métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aunque la técnica de van Embden sigue utilizándose en casos particulares (16).

La técnica de tipificación con oligonucleótidos espaciadores (*spoligotyping*) mediante PCR del *locus* DR (*direct repeat*) (17), así como el MIRU-VNTR (18), han reemplazado la prueba de RFLP-IS6110, ya que su complejidad técnica es menor, tienen portabilidad de resultados, y las bases de datos internacionales permiten la comparación con las colecciones de aislamientos de diversos orígenes geográficos, el intercambio de información, la visualización de la distribución global de los linajes genotípicos del complejo *M. tuberculosis* y el seguimiento de la dispersión de los aislamientos de alto riesgo por su virulencia y su resistencia a los medicamentos convencionales, así como información siempre creciente sobre múltiples marcadores genéticos (19,20) y herramientas computacionales (21) de análisis. Ello genera una red para el estudio global de la epidemiología de la tuberculosis y permite un acercamiento a la exploración de los aspectos evolutivos del complejo *M. tuberculosis* (22).

En este estudio, se utilizó la técnica MIRU-VNTR para la genotipificación de 105 muestras de ADN obtenidas del esputo o de aislamientos clínicos de una población de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar en Cali, con el objetivo de describir los patrones genéticos de *M. tuberculosis* en la población de estudio, compararlos con otros estudios llevados a cabo en esta ciudad y el mundo, y plantear hipótesis sobre las posibles asociaciones entre las agrupaciones encontradas en los aislamientos y las variables sociodemográficas.

Materiales y métodos

Población de estudio

Entre 2013 y 2015, se seleccionaron 105 pacientes atendidos en varias instituciones prestadoras de servicios de salud que participan en el Programa de Control de la Tuberculosis de la Secretaría de Salud Pública Municipal de Cali. En el marco de un convenio interadministrativo entre esa Secretaría y la Universidad del Valle, se obtuvieron las muestras de los pacientes, la ficha de la notificación epidemiológica del caso y el consentimiento informado.

Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Micobacterias del Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle. Se repitió la baciloscopia mediante tinción de Zielh-Nielsen en las muestras para confirmar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) y, además, se las descontaminó con el método de Petroff modificado con hidróxido de sodio (NaOH) y N-acetilcisteína (23) para luego cultivarlas en medio Lowenstein-Jensen e incubarlas a 37 °C hasta conseguir su crecimiento durante un máximo de 12 semanas, con el fin de ratificar el diagnóstico.

Caracterización sociodemográfica y epidemiológica

Se recolectaron los datos sociodemográficos y epidemiológicos de las fichas de notificación utilizadas para el ingreso de los pacientes al Programa de Control de la Tuberculosis de la Secretaría de Salud de la ciudad: edad, sexo, lugar de residencia, ocupación, condición de ingreso (caso nuevo, recaída o reingreso). Además, en el marco del convenio y con autorización del Programa, se tuvo acceso a los resultados de las pruebas de sensibilidad a los fármacos antituberculosos.

Por otra parte, se tuvieron en cuenta condiciones de riesgo como el abandono del tratamiento, el contacto previo con personas con tuberculosis, y las condiciones médicas debilitantes del sistema inmunitario; entre estas últimas, se consideraron la desnutrición, el embarazo y la pertenencia a grupos con una alta tasa de transmisión, como habitantes de calle, farmacodependientes o infectados con HIV, entre otros.

Para garantizar la confidencialidad de los datos y para la protección de los pacientes, se utilizó un sistema de codificación numérica de identificación de todos los pacientes y sus muestras.

Análisis moleculares

Para la genotipificación se extrajo ADN a partir de las muestras de esputo de los pacientes. En los casos en que la concentración de ADN era menor de 10 ng/ μ l, la extracción se hizo a partir de una unidad formadora de colonia (UFC) obtenida del cultivo.

Extracción de ADN. El ADN de las muestras (esputo o cultivo) se extrajo utilizando el estuche de extracción Genolyse™ (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemania). Se hicieron ensayos preliminares para comprobar la compatibilidad del ADN obtenido con la genotipificación (no se incluyen los datos). La calidad y la cantidad del ADN obtenido se evaluaron con el equipo NanoDrop™ (Thermo Scientific, Estados Unidos).

Genotipificación MIRU-VNTR. Se siguió la metodología descrita por Supply, *et al.* (18), para un análisis de 24 *loci*. Las PCR se hicieron usando el estuche HotStartTaq DNA Polymerase™ (Qiagen, Hilden, Alemania). Este método se basa en la amplificación por PCR de un set estándar de 24 *loci*, con cebadores específicos para cada *locus* de repetición y en la determinación de los tamaños de los amplicones, los cuales reflejan los números de las copias específicas. Como control positivo y de calidad de las amplificaciones, se usó ADN de la cepa de referencia del complejo *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294).

Los amplicones obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Agarose I™, Amresco, USA) al 2 % a 110 V durante una hora. Los tamaños de los amplicones se estimaron por comparación con marcadores de peso molecular de 50 (GeneRuler 50 pb DNA Ladder™, Thermo Scientific, USA) y 100 pares de bases (pb) (GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder™, Thermo Scientific, USA). La asignación de los varios alelos VNTR se hizo con el programa GelAnalyzer 2010 (Lazar software, USA).

Interpretación de resultados

Análisis de relación genética. Las relaciones genéticas entre los aislamientos se visualizaron en el dendrograma obtenido con el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (24) y utilizando el coeficiente de distancia categórica obtenido con las herramientas disponibles en la base de datos MIRU-VNTRplus (<https://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>).

Análisis de la diversidad alélica de los MIRU-VNTR. La diversidad alélica (h) en un *locus* dado y la diversidad alélica media (H), se calcularon como $h = 1 - \sum x_i^2 / [n \cdot (n-1)]$ y $H = (1/n) \sum h_i$, respectivamente, donde x_i es la frecuencia de alelo i -ésimo en el *locus*, h_i la diversidad alélica en el *locus* i y n el número de *loci*. También, se calculó el índice de discriminación de Hunter-Gaston.

Comparación con bases de datos internacionales

Los resultados obtenidos se compararon con las bases de datos MIRU-VNTRplus (<https://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>) para la clasificación basada en minisatélites (incluidos los 24 loci MIRU analizados) de los aislamientos dentro de los diferentes linajes conocidos del complejo *M. tuberculosis*, y también con los datos encontrados en la base SITVITWEB (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/). Para esta última comparación, se utilizó solamente un set de 12 loci MIRU que ya habían sido descritos por el autor (20).

Aspectos éticos

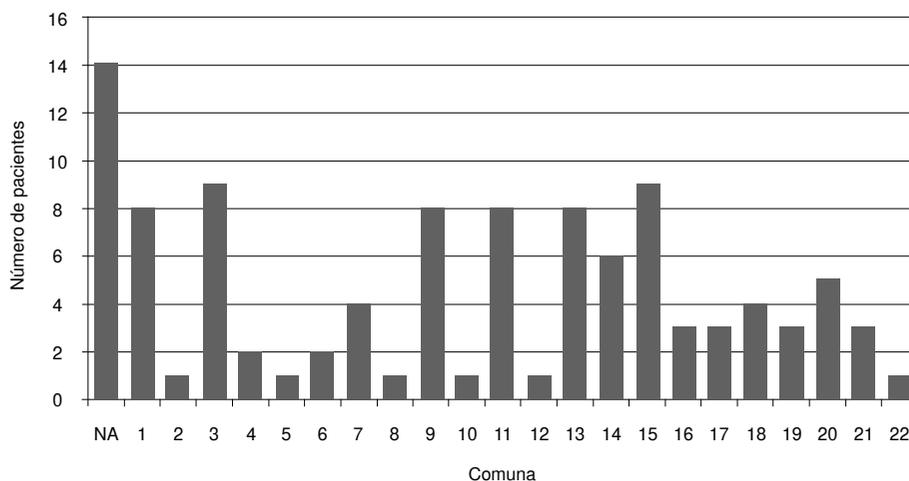
El estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle y por la Secretaría de Salud Pública Municipal de Santiago de Cali. Los participantes del estudio firmaron un consentimiento informado. Todos los datos y consentimientos firmados fueron conservados en físico y guardados en custodia del investigador principal para mantener la anonimidad de los pacientes. El estudio no interfirió en las actividades rutinarias del programa de tuberculosis relacionadas con el seguimiento de los casos y la administración del tratamiento.

Resultados

Caracterización sociodemográfica

La edad promedio de los pacientes era de 40,8 ($\pm 15,2$) años, con un rango de 17 a 78 años. La mayoría era de sexo masculino (64,7 %; 68/105) y estaba afiliada al régimen subsidiado de salud (71,2 %; 73/105). En cuanto a sus ocupaciones, las más frecuentes se relacionaban con trabajos no calificados (20,0 %; 21/105) y con el área de servicio y de ventas (14,3 %; 15/105). En cuanto a la etnia, el 66,7 % (70/105) de los pacientes se clasificó en la categoría “otros” y el 14,3 % (15/105) como población afrodescendiente.

Se incluyeron pacientes de la mayoría de comunas de Cali (con excepción de las comunas 21 y 22), con un paciente por comuna, por lo menos (figura 1). Los resultados detallados con la información sociodemográfica de los pacientes se presentan en el cuadro 1.



NA: habitantes de la calle, cuya comuna de residencia no estaba registrada.

Figura 1. Distribución por comunas de la población de estudio

Cuadro 1. Caracterización sociodemográfica de los pacientes, según la Clasificación Internacional Uniforme de Ocupaciones, adaptada para Colombia por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística con algunas modificaciones

Variable	n	%
Sexo		
Masculino	68	64,8
Femenino	37	35,2
Etnia		
Afrodescendientes	15	14,3
Indígena	1	1,0
Mestizo	3	2,9
Otros	70	66,7
Romaní	1	1,0
SD	15	14,3
Ocupación		
Profesionales universitarios	1	1,0
Técnicos	2	1,9
Área de servicios y vendedores	15	14,3
Agricultura, ganadería y pesca	4	3,8
Industria manufacturera, construcción y minería	4	3,8
Operadores de instalaciones, de máquinas y ensambladores	1	1,0
Trabajadores no calificados	21	20,0
Desempleados	26	24,8
Estudiantes	3	2,9
En condición de reclusión	8	7,6
SD	20	19,1
Régimen de salud		
Contributivo	14	13,3
Subsidiado	73	69,5
Sin afiliación	13	12,4
SD	5	4,8

SD; sin dato

Caracterización epidemiológica

El 71,4 % (75/105) de los casos se habían notificado como nuevos; 10,5 % (11/105) de ellos eran recaídas y 5,7 % (6/105), ingresos después de abandono de tratamiento. El 5,7 % (6/105) de los pacientes fueron seropositivos en la prueba de infección concomitante con HIV y el 18,1 % (19/105) se registraron como negativos. Sin embargo, no se registraron resultados de esta prueba en el 76,2 % (80/105) de los pacientes.

Solo el 8,6 % (9/105) de los pacientes dijo tener conocimiento de un contacto previo con personas con tuberculosis. El 29,6 % (29/105) de los pacientes presentó alguna condición de riesgo asociada con la tuberculosis, entre ellas, farmacodependencia (8,6 %; 9/105), diabetes (4,8 %; 5/105) y desnutrición (3,8 %; 4/105). En el estudio participaron habitantes de calle (9,5 %; 10/105) y reclusos (7,6 %; 8/105). Los resultados detallados de la información epidemiológica se presentan en el cuadro 2.

Sensibilidad a fármacos

Al analizar los resultados de las pruebas de sensibilidad a los medicamentos, el 85,7 % (90/105) de los casos era sensible a la rifampicina y la isoniazida. El 14,3 % (15/105) presentó resistencia, por lo menos, a uno de estos medicamentos y se notificaron 7 casos (6,7 %) de tuberculosis multirresistente (ambos medicamentos).

Cuadro 2. Caracterización epidemiológica de los casos del estudio

Variable	n	%
Condición de ingreso al Programa de Control de la Tuberculosis de la Secretaría de Salud Pública de Cali		
Primera vez	75	71,4
Recaída	11	10,5
Reingreso	6	5,7
SD	13	12,4
Factores de riesgo		
Leucemia	1	1,0
Farmacodependencia	9	8,6
Diabetes mellitus	5	4,8
Desnutrición	4	3,8
Desnutrición y farmacodependencia	6	5,7
Desnutrición, farmacodependencia y enfermedad pulmonar crónica	3	2,9
Embarazo	1	1,0
Contacto previo		
Sí	9	8,6
No	26	24,8
SD	70	66,7
Prueba de HIV		
Positiva	6	5,7
Negativa	19	18,1
SD	80	76,2
Sensibilidad a medicamentos		
Resistencia a la rifampicina	3	2,9
Resistencia a la isoniacida	5	4,8
Multiresistencia	7	6,7
Sensible a los dos medicamentos	90	85,7

SD; sin dato

Análisis moleculares

El 60,0 % (62/105) de las muestras de ADN se genotipificaron mediante la técnica MIRU-VNTR, amplificando por PCR los 24 *loci* estudiados (cuadro 3). En el 35,2 % (37/105) restante, no se obtuvo amplificación ni siquiera en uno de los *loci* MIRU.

Por otro lado, se observaron alelos múltiples en 5,7 % (6/105) de los aislamientos. El aislamiento 91 presentó alelos dobles en múltiples *loci* (MIRU 42, 40, 10, 47, 52, 53, ETR-A, ETR-B), por lo cual se sospechó la posible presencia de una infección por más de un genotipo en este paciente. La ficha de notificación para este caso estaba incompleta y los datos registrados no proporcionaron información relevante que pudiera asociarse con esta condición. Para los análisis de diversidad alélica y de relación genética, solo se tuvieron en cuenta los perfiles MIRU de aquellas muestras que tuvieron amplificaciones positivas para todos los 24 *loci* MIRU y que no presentaron alelos múltiples.

Los *loci* con la mayor diversidad alélica (>0,7) y mayor capacidad diferenciadora fueron QUB26, QU11b, MIRU 10 y MIRU 40. En estos *loci* se observó la mayor cantidad de alelos diferentes. En cambio, los *loci* MIRU 20, MIRU 39, MIRU 46 y MIRU 24 presentaron las menores diversidades alélicas (entre 0,00 y 0,02), y los dos últimos fueron monomorfos, ya que solo presentaron un alelo común en todos los aislamientos (cuadro 4). Con base en estos datos, se obtuvo una diversidad alélica media (H) de 0,461.

Cuadro 3. Perfiles MIRU de los aislamientos

Aislamiento	Código MIRU	Aislamiento	Código MIRU
1	134203332224126153322622	63	234343322224225153334922
2	234233422324225153333522	64	242235232424226153131722
3	244212132124116132532322	65	134204332404136153222622
4	124204332124126153222522	67	122234332224126153323622
7	134204332214126153322622	69	234223422424235153233522
8	114204332224116153322622	82	244214232324116151332232
9	223236332434435153234742	92	222233332334425153233742
10	214243231634225153339522	96	13420433241s4126153222622
12	134204332224126153322622	98	234342212444225153334522
13	213245322534435153233732	106	222234232224226153131722
14	134204232424126153222822	111	223236332424435153234742
16	134204332444126153522622	120	134204332224126153322622
17	134204332224126153222622	124	244214232414156153132232
18	232234232424226153131722	142	124204332224126153322622
19	223235332534426153334742	146	244442312344225153334522
21	223234332424435153334742	155	233236432434435153233742
22	244212132424146142132822	159	223234322534425153423432
24	213233332534435153233742	161	134204332224126153322622
25	223233232534425153343742	163	134204332224126153322622
26	234214232414156153232232	168	244214232324116153532232
28	232233232424226153331722	170	334333411443225153323722
30	134203332224126153323622	206	144205432224126153322632
33	213236332534435153232742	213	233236332434435153233742
36	224213352944425173342821	216	242235332424226153131732
37	124204232224126133322622	222	234132322534225153333222
39	244213231424126183332422	224	223235332434435153233732
40	234332322344225153134522	244	134204332225126153322622
41	223235332524425153333742	246	232224232424226153131722
42	134204332224126153322622	249	233332312334225153333522
47	233336332534435153233432	254	252245332424226163131732
62	223235322534435153233732	267	234213352944425172333823

Cuadro 4. Diversidad alélica por locus MIRU-VNTR

Locus	(h)	IC	K	Locus	(h)	IC	K
QUB26	0,772	0,712-0,832	8	MIRU 31	0,506	0,431-0,580	3
QUB-11b	0,758	0,702-0,815	7	VNTR 48	0,500	0,376-0,624	5
MIRU 10	0,742	0,676-0,808	5	MIRU 23	0,500	0,468-0,532	2
MIRU 40	0,710	0,648-0,773	5	MIRU 2	0,466	0,381-0,551	3
VNTR 52	0,698	0,633-0,763	5	1955	0,385	0,244-0,526	4
VNTR 42	0,677	0,600-0,755	5	MIRU 04	0,235	0,103-0,368	4
VNTR 47	0,662	0,624-0,699	3	MIRU 26	0,214	0,078-0,349	6
VNTR 49	0,653	0,575-0,731	5	MIRU 27	0,124	0,015-0,234	3
ETRA	0,627	0,531-0,723	6	MIRU 20	0,094	0,000-0,190	2
VNTR 43	0,565	0,471-0,660	3	VNTR 46	0,064	0,000-0,148	3
VNTR53	0,544	0,438-0,651	3	MIRU 39	0,064	0,000-0,148	3
MIRU 16	0,526	0,414-0,638	4	MIRU 24	0,000	0,000-0,109	1

(h): diversidad alélica; IC: intervalos de confianza; K: número de alelos diferentes observados; MIRU: *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*

Análisis de relación genética

En la figura 2 se observa el dendrograma obtenido con el algoritmo UPGMA de los aislamientos seleccionados y sus perfiles MIRU. Se obtuvieron 58 perfiles diferentes para los 62 aislamientos. Como puede observarse, solo los aislamientos 12, 42, 120, 161 y 163, provenientes de pacientes diferentes, presentaron el mismo perfil MIRU, lo cual demuestra el gran poder de discriminación de la técnica (HGDI=0,9947).

Conociendo las limitaciones debidas al tamaño de la población, en este punto se decidió no hacer un análisis por conglomerados (agrupaciones formadas por dos o más aislamientos con un mismo patrón) para contrastarlo con las variables sociodemográficas obtenidas, pues los resultados podrían estar determinando relaciones que podrían no ser ciertas para la población general de la ciudad.

Comparación con las bases de datos internacionales

Con base en la comparación de los resultados obtenidos con las bases de datos de MIRU-VNTRplus, los aislamientos estudiados se pudieron clasificar según el linaje filogenético. Primero, se hizo un análisis a partir de la mejor coincidencia (*best match*) con un punto de corte de distancia por defecto (0,17), el cual presentó una tolerancia de una diferencia de cuatro *loci* máximo entre los aislamientos comparados. Se encontró que el 58,7 % de los aislamientos fueron asignados a un linaje desconocido, 30,2 % se ubicaron dentro del linaje LAM; 4,8 % dentro del linaje Haarlem; 3,2 % fueron asignados al linaje S y, por último, un aislamiento (1,6 %) se clasificó dentro del linaje Cameroon.

Para clasificar aquellos aislamientos que no fueron asignados a ninguno de los linajes, se hizo un análisis mediante un dendrograma que incluyó las cepas de referencia de la base de datos. Con esta nueva clasificación, finalmente se obtuvo una distribución de 54,8 % (34/62) en el linaje de LAM, de 25,8 % (16/62) en el de Haarlem, de 14,5 % (9/62) en el S, de 3,2 % (2/62) en el Beijing y de 1,6 % en el Cameroon (1/62) (cuadro 5).

Además, se contrastaron los resultados con la base de datos SITVITWEB, la cual tiene en cuenta el análisis por MIRU-VNTR, pero en su versión de 12 *loci*. Una vez filtrados los *loci* adecuados, se encontró que 21 aislamientos (33,9 %) presentaban patrones huérfanos sin semejanza con ninguno de los perfiles MIRU encontrados en la base de datos (cuadro 5). Los aislamientos quedaron representados por 17 MIT diferentes, los cuales se asignan cuando los perfiles, por lo menos, de dos aislamientos coinciden formando un nuevo grupo. Entre ellos, los más frecuentes fueron el MIT 190 y el MIT 110, con 22,6 % (14/62) y 6,5 % (4/52), respectivamente. Los demás aislamientos se distribuyeron uniformemente entre los otros MIT encontrados (cuadro 5).

Relación entre las variables sociodemográficas y epidemiológicas y los análisis de relación genética

Tres de los cuatro casos de pacientes positivos para HIV que se genotipificaron completamente, correspondían al linaje LAM y, solo uno, al linaje Haarlem. No se encontraron correlaciones entre las variables sociodemográficas y epidemiológicas, y la asignación de los aislamientos a un linaje determinado.

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical

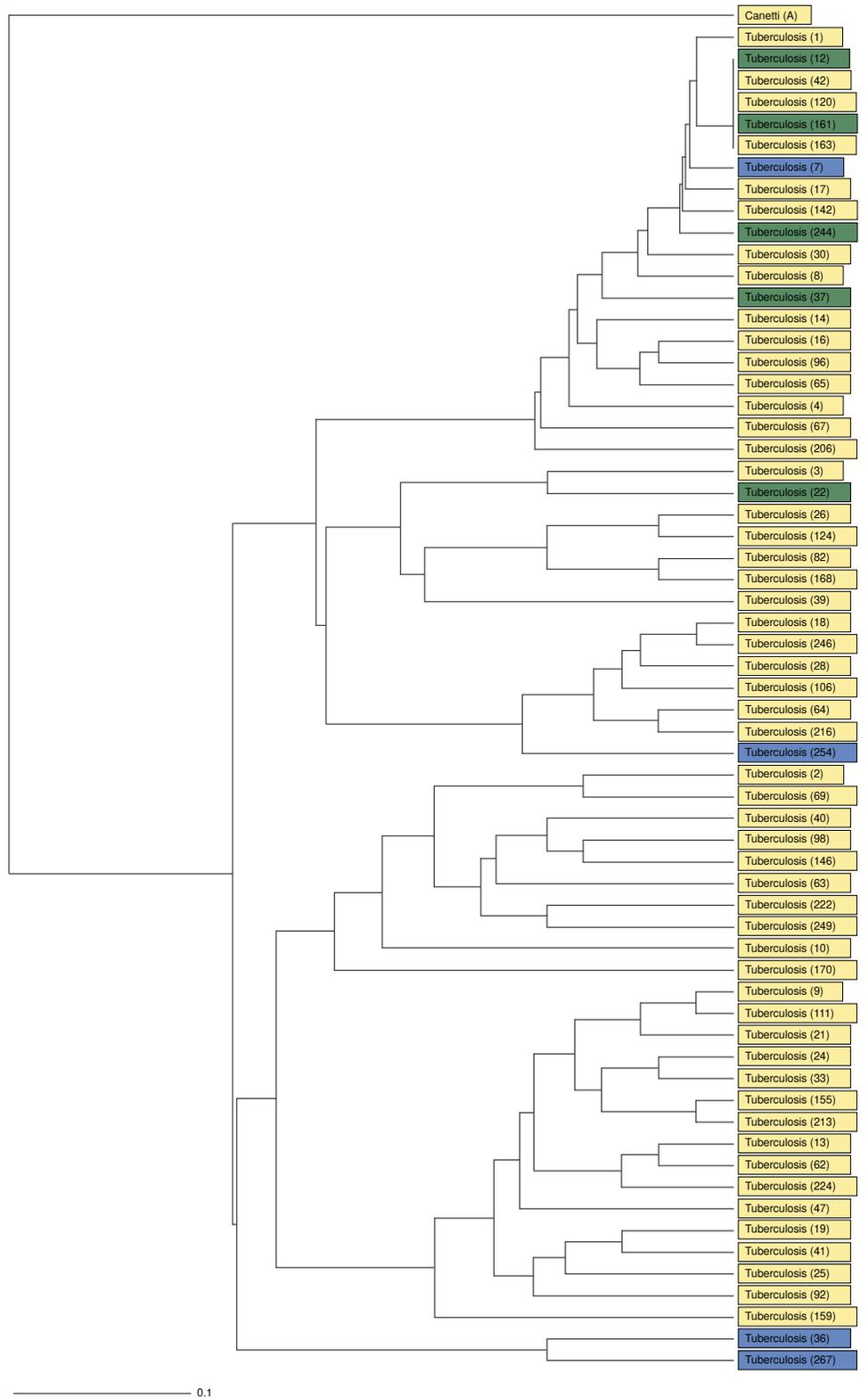


Figura 2. Dendrograma obtenido con el algoritmo UPGMA de los perfiles MIRU. Se resaltan en color verde los aislamientos que presentaron resistencia a rifampicina o isoniazida; en color azul, los aislamientos con multiresistencia.

Cuadro 5. Distribución por linajes y MIT de los aislamientos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en la población estudiada

Aislamiento	Linaje	MIT	Aislamiento	Linaje	MIT
1	LAM (*)	h	63	S (*)	212
2	S (+)	382	64	LAM (*)	h
3	LAM (+)	h	65	LAM (+)	190
4	LAM (+)	190	67	LAM (*)	h
7	LAM (*)	190	69	S (+)	157
8	LAM (*)	190	82	LAM (+)	h
9	Haarlem (+)	110	92	Haarlem (*)	116
10	Cameroon (*)	263	96	LAM (+)	190
12	LAM (*)	190	98	S (*)	h
13	Haarlem (+)	46	106	LAM (+)	242
14	LAM (+)	h	111	Haarlem (+)	110
16	LAM (+)	190	120	LAM (*)	190
17	LAM (*)	190	124	LAM (+)	25
18	LAM (*)	242	142	LAM (*)	190
19	Haarlem (*)	247	146	S (+)	h
21	Haarlem (+)	33	155	Haarlem (+)	h
22	LAM (+)	h	159	Haarlem (+)	187
24	Haarlem (+)	116	161	LAM (*)	190
25	Haarlem (+)	h	163	LAM (*)	190
26	LAM (+)	25	168	LAM (+)	25
28	LAM (*)	753	170	S (+)	h
30	LAM (*)	h	206	LAM (+)	h
33	Haarlem (+)	110	213	Haarlem (+)	110
36	Beijing (+)	h	216	LAM (*)	247
37	LAM (+)	h	222	S (+)	h
39	LAM (+)	h	224	Haarlem (*)	45
40	S (+)	109	244	LAM (*)	190
41	Haarlem (*)	45	246	LAM (*)	510
42	LAM (*)	190	249	S (+)	109
47	Haarlem (+)	h	254	LAM (+)	h
62	Haarlem (+)	45	267	Beijing (+)	h

MIT: *MIRU International Types*

Los linajes de los aislamientos se designaron según el análisis de mejor coincidencia (*best match*) (*) y el árbol filogenético (+) al compararlos con la información sobre las cepas almacenada en la base de datos MIRUVNTRplus. Se encontraron patrones MIRU huérfanos (h) que no presentaron coincidencias con las cepas notificadas hasta el momento en la base SITVITWEB.

Discusión

Entre los 62 casos que se genotipificaron completamente mediante la técnica MIRU-VNTR, no hubo una frecuencia alta de transmisión reciente, es decir, grupos de pacientes cuyos aislamientos coincidieran en cuanto a sus perfiles genéticos. Por el contrario, se observó un gran número de genotipos (58 perfiles diferentes) asociados con la circulación de dichos aislamientos en esta población y solo cinco pacientes resultaron agrupados en los análisis (figura 2). Al consultar los datos de estas personas, se encontró que no tenían ningún vínculo epidemiológico y que, además, residían en diferentes comunas de la ciudad. El hecho de no haber encontrado un mayor número

de casos agrupados, podría explicarse como un efecto del tamaño de la muestra y de la poca representatividad espacial del número de aislamientos recolectados, ya que en muchas de las comunas de donde provenían los casos solo se obtuvieron uno o dos aislamientos.

Sin embargo, este hallazgo resalta la importancia de los estudios estructurados desde el punto de vista epidemiológico, que se complementen con herramientas moleculares como la técnica usada en este y se centren, no solo en la caracterización genética de los aislamientos, sino en la determinación de las posibles cadenas de transmisión, para contribuir al conocimiento de la dinámica de contagio de la tuberculosis pulmonar en la ciudad.

Por ejemplo, en un estudio previo, se evidencia la eficiencia de la técnica MIRU-VNTR para diferenciar los casos de aquellos pacientes que no están relacionados epidemiológicamente, así como su utilidad en estudios poblacionales para una rápida identificación de los aislamientos (25).

En cuanto a la diversidad alélica en cada *locus*, en este estudio los *loci* MIRU 10, QU11b y QUB26 fueron los de mayor diversidad alélica y, por ende, mayor poder de discriminación, en tanto que los *loci* MIRU 20, MIRU 39, MIRU 46 y MIRU 24 fueron los menos diversos. Estos resultados coinciden con los de estudios previos realizados en Bogotá y en diferentes regiones de Colombia, entre ellas, la ciudad de Cali (26-28), lo cual plantearía la posibilidad de escoger un set estándar con un menor número de *loci* para la tipificación de aislamientos en estudios posteriores que alcancen un poder de discriminación cercano al obtenido por la técnica en su versión de 24 *loci*.

Distribución de los linajes del complejo *M. tuberculosis*

En el análisis de clasificación por linaje de los aislamientos, se encontró un predominio del linaje LAM (54,8 %), seguido del Haarlem (25,8 %) y el S (14,5 %), los cuales son las familias genéticas de mayor prevalencia en la población general del país y de Latinoamérica (28,29). Los resultados obtenidos difieren de los encontrados por Realpe, *et al.* (27), en cuyo estudio los linajes LAM y Haarlem representaron el 39,1 y el 39,0 %, respectivamente, en los aislamientos provenientes de Cali, en tanto que no se encontró ningún aislamiento del linaje Beijing.

El hallazgo de aislamientos del linaje Beijing (3,2 %) en el presente estudio podría responder a la cercanía de esta ciudad con el puerto de Buenaventura, donde se ha notificado previamente la presencia de este linaje (30).

Resulta atípico, en cambio, el hallazgo de un aislamiento relacionado con el linaje Cameroon, pues hasta el momento no hay estudios que indiquen su presencia en Colombia. Además, este linaje se encuentra asociado con poblaciones africanas (31) y la revisión de los datos del caso no evidenció ninguna correlación importante. Por otra parte, es recomendable hacer un análisis con un segundo marcador y una evaluación más detenida del perfil de resistencia a otros fármacos de este aislamiento para confirmar la validez de esta observación.

En los casos de infección concomitante con el HIV, se encontró con mayor frecuencia el linaje LAM, resultado que coincide con los hallazgos de Castro, *et al.*, en cuyo estudio el 31,7 % de los aislamientos genotipificados pertenecía a esta familia genética (29). Por el contrario, en los estudios de Cerezo, *et al.*, y Beltrán, *et al.*, se encontró un predominio del linaje Haarlem (26,28). Esto indica que se requieren más estudios a nivel nacional para evaluar la dinámica de transmisión de la tuberculosis en esta población.

En este estudio, se encontraron 21 patrones huérfanos en la comparación con la base de datos del SITVITWEB, es decir, se aportaron nuevos perfiles genéticos basados en la MIRU-VNTR al establecimiento de la estructura poblacional del complejo *M. tuberculosis* en la ciudad. Además, estos patrones huérfanos se compararon con los obtenidos Realpe, *et al.* (27), (no se presentan los datos) y no se encontraron semejanzas. La genotipificación con otras técnicas, como el *spoligotyping* o el RFLP-IS6110, puede ser útil para superar ambigüedades en la clasificación y validar los hallazgos, tal como se ha hecho en varias investigaciones en el mundo (32,33).

Asimismo, la comparación con la base de datos del SITVITWEB evidenció la dispersión de los aislamientos entre varios grupos de MIT, y los más frecuentes fueron el MIT 190 y el 110, los cuales se han encontrado también en Bogotá (26). Sin embargo, algunos no se han sido notificado en otras ciudades, lo cual demuestra las posibles diferencias en la distribución de genotipos entre las ciudades de Colombia (cuadro 4).

Sin despreciar el gran aporte que han significado estos estudios, aún quedan muchos vacíos sobre la distribución de los linajes del complejo *M. tuberculosis* y su dinámica de transmisión en Colombia.

Limitaciones del estudio

A pesar de contar con 62 perfiles MIRU-VNTR dispersos en la zona urbana de Cali, es claro que la muestra estudiada no es representativa de la diversidad genética asociada con la circulación del complejo *M. tuberculosis* en la ciudad, pues se observó una gran variabilidad genética entre los casos estudiados. Sin embargo, los resultados constituyen un aporte al trabajo de vigilancia y seguimiento de la transmisión reciente de aislamientos en la población, así como a la detección de casos de transmisión insospechada en etapas tempranas y de cepas resistentes a los medicamentos.

La mayoría de las fichas de notificación de los casos no estaban completas, lo cual afecta los análisis estadísticos, la interpretación de los datos y las conclusiones que se puedan obtener de este tipo de estudios.

Por otro lado, la alta tasa de casos en los cuales no se obtuvo una amplificación completa de todos los *loci* MIRU/VNTR, pudo haberse debido a que, en la mayoría de casos, el ADN se extrajo a partir de muestras de esputo. En el estudio de Bidovec-Stojkovič, *et al.* (34), se evidenció el efecto que tiene la baja densidad de BAAR observados en la baciloscopia en la genotipificación. También, es probable que se encontraran en las muestras inhibidores de la reacción de amplificación.

En conclusión, este estudio permitió evidenciar la distribución de los linajes de aislamientos del complejo *M. tuberculosis* en una población de pacientes residentes en Cali con tuberculosis pulmonar. Se demostró el predominio de los linajes LAM y Haarlem en la población, lo cual coincide con las observaciones de estudios previos. La técnica MIRU-VNTR permitió la identificación de una gran variedad de genotipos que circulaban en la población y, también, de casos de posible transmisión reciente y casos de infección por varios genotipos. En estudios posteriores con una muestra de mayor tamaño y el uso de otros marcadores moleculares, se podrían dilucidar las posibles asociaciones entre la distribución de los linajes y aspectos específicos de la relación patógeno-huésped que hayan podido condicionar el predominio estos linajes en la población de la ciudad.

Agradecimientos

A Leonor Oviedo, por el apoyo técnico, al Programa de Control de Tuberculosis de la Secretaría de Salud de Santiago de Cali, por la autorización para utilizar las muestras en este estudio, y al Laboratorio de Virología de la Universidad del Valle.

Referencias

1. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. p. 224.
2. Organización Mundial de la Salud. Preguntas y respuestas: tuberculosis ultrarresistente (TB-XR). Fecha de consulta: 27 de mayo de 2018. Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/extensively-resistant-tuberculosis/es/>
3. Pedraza L, García C, Muñoz A. Caracterización de pacientes con tuberculosis y tuberculosis resistente a múltiples medicamentos en instituciones de tercer nivel de Bogotá D.C. *Enferm Glob*. 2012;25:129-38 <https://doi.org/10.4321/S1695-61412012000100008>
4. Instituto Nacional de Salud. Informe del evento tuberculosis, Colombia, 2017. Fecha de consulta: 27 de mayo de 2018. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/TUBERCULOSIS%202017.pdf>
5. Secretaría Departamental del Salud del Valle. Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 52 de 2015. Fecha de consulta: 10 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.valledelcauca.gov.co/salud/descargar.php?id=17080>
6. Secretaría Departamental del Salud del Valle. Informe anual, 2016: Vigilancia en salud pública. Fecha de consulta: 27 de mayo de 2017. Disponible en: <http://www.valledelcauca.gov.co/salud/descargar.php?id=19934>
7. Mathema B, Kurepina N, Bifani P, Kreiswirth B. Molecular epidemiology of tuberculosis: Current insights. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19:658-85. <https://doi.org/10.1128/CMR.00061-05>
8. Kato-Maeda M, Small P. How molecular epidemiology has changed what we know about tuberculosis. *West J Med*. 2000;172:256-9.
9. van Soolingen D, De Haas W, Kremer K. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of micobacteria. *Methods Mol Med*. 2001;54:165-203. <https://doi.org/10.1385/1-59259-147-7:165>
10. Chaoui I, Zozio T, Lahlou O, Sabouni R, Abid M, El Aouad R, *et al*. Contribution of spoligotyping and MIRU-VNTRs to characterize prevalent *Mycobacterium tuberculosis* genotypes infecting tuberculosis patients in Morocco. *Infect Genet Evol*. 2014;21:463-71. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.05.023>
11. Cowan L, Mosher L, Diem L, Massey J, Crawford J. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J. Clin Microbiol*. 2002;40:1592-602. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.5.1592-1602.2002>
12. Pitondo-Silva A, Santos A, Jolley K, Leite C, Darini A. Comparison of three molecular typing methods to assess genetic diversity for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods*. 2013;93:42-8. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.01.020>
13. Barnes P, Cave M. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med*. 2003;349:1149-56. <https://doi.org/10.1056/NEJMra021964>
14. van Embden J, Cave M, Crawford J, Dale J, Eisenach K, Gicquel B, *et al*. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*. 1993;31:406-9.
15. Rozo J, Ribón W. Molecular tools for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping. *Rev Salud Pública (Bogotá)*. 2010;12:510-21.
16. Cowan L, Diem L, Monson T, Wand P, Temporado D, Oemig T, *et al*. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *J Clin Microbiol*. 2005;43:688-95. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.688-695.2005>
17. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*. 1997;35:907-14.

18. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsche-Gerdes S, Willery E. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006;44:4498-510. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-06>
19. Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol. 2008;46:2692-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.00540-08>
20. Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, et al. SITVITWEB – A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. Infect Genet Evol. 2012;12:755-66. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.02.004>
21. Shabbeer A, Ozcaglar C, Yener B, Bennett K. Web tools for molecular epidemiology of tuberculosis. Infect Genet Evol. 2012;12:767-81. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.019>
22. García de Viedma D, Mokrousov I, Rastogi N. Innovations in the molecular epidemiology of tuberculosis. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29:8-13. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70012-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70012-X)
23. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 2: Cultivo. Fecha de consulta: 10 de febrero de 2015. Disponible en: <http://www1.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-labs-cultivo.pdf>
24. Sneath P, Sokal R. Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco, CA: Freeman and Company; 1973. p. 549.
25. Rodríguez N, Martínez M, Herranz M, Sánchez M, Barroso P, Bouza E, et al. Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* epidemiology studies. BMC Microbiol. 2008;8:34. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-34>
26. Cerezo I, Jimenez Y, Hernández J, Zozio T, Murcia M, Rastogi N. First insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. Infect Genet Evol. 2012;12:657-63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.006>
27. Realpe T, Correa N, Rozo J, Ferro B, Gómez V, Zapata E, et al. Population structure among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients in Colombia. PLoS One. 2014;9:1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093848>
28. Beltrán MY. Genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* en aislados clínicos obtenidos de pacientes VIH positivos de los hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá (tesis). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2016. p. 106.
29. 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, 2012. Biomédica. 2017;37:86-95. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3112>
30. Nieto L, Ferro B, Villegas S, Mehaffy C, Forero L, Moreira C, et al. Characterization of extensively drug-resistant tuberculosis cases from Valle del Cauca, Colombia. J Clin Microbiol. 2012;50:4185-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.01946-12>
31. Wirth T, Hildebrand F, Allix C, Wölbeling F, Kubica T, Kremer K, et al. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PLoS Pathog. 2008;4:1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000160>
32. Barletta F, Otero L, Collante J, Asto B, de Jong B, Seas C, et al. Genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* complex in patients with no known risk factors for MDR-TB in the North-Eastern of Lima, Perú. BMC Infect Dis. 2013;13:397. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-397>
33. Lu W, Lu B, Liu Q, Dong H, Shao Y, Jiang Y, et al. Genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in rural China: Using MIRU-VNTR and spoligotyping methods. Scand J Infect Dis. 2014;26:98-106. <https://doi.org/10.3109/00365548.2013.858182>
34. Bidovec-Stojković U, Seme K, Žolnir-Dovč M, Supply P. Prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* from fresh clinical samples. PLoS One. 2014;9:e109547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109547>

Artículo original

Caracterización de los pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en un hospital militar de alta complejidad

Natalie Náder^{1,2,3}, Ramón Iván Medina^{1,2,3}, Luz Ángela Pescador³, Barbarita María Mantilla^{1,2,3}, Juan Sebastián Bravo^{1,2,3}, Carlos Hernando Gómez^{3,4}

¹ Servicio de Medicina Interna, Hospital Militar Central, Bogotá, D.C., Colombia

² Facultad de Medicina, Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, D.C., Colombia

³ Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Hospital Militar Central, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Servicio de Infectología, Hospital Militar Central, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. En las Fuerzas Militares de Colombia, cerca de 500.000 de sus miembros asisten a consulta en los establecimientos sanitarios militares. En esta población, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SAMR) se ha convertido en un agente patógeno de gran incidencia.

Objetivo. Caracterizar los pacientes con diagnóstico de bacteriemia por SAMR en el Hospital Militar Central entre el 2012 y el 2015.

Materiales y métodos. Se llevó a cabo un estudio observacional descriptivo de revisión retrospectiva de historias clínicas de pacientes mayores de 18 años, hospitalizados y con hemocultivos positivos para *S. aureus* resistente a la meticilina. Para la identificación de los pacientes se empleó el sistema Whonet, version 5.6.

Resultados. De los 177 cultivos positivos para *S. aureus*, el 24,8 % (n=44) correspondió a SAMR, con mayor prevalencia en pacientes militares activos (n=20m 45,4 %). Se observó una frecuencia similar para la bacteriemia por SAMR adquirida en la comunidad y la adquirida en el hospital, siendo más frecuente (n=37, 84 %) el fenotipo de la comunidad en ambos grupos. El principal foco infeccioso fueron los tejidos blandos, seguidos por el tejido pulmonar. Se presentaron mayores tasas de complicaciones (61%, n=13) en la bacteriemia adquirida en el hospital; 34,9 % (n=15), de los pacientes tuvieron una estancia hospitalaria prolongada atribuible a las complicaciones desencadenadas por la bacteriemia.

Conclusiones. La población más afectada por SAMR fueron los pacientes militares activos (n=20, 45,4 %), con una frecuencia similar de la bacteriemia adquirida en la comunidad (n=18, 43,2 %) y la adquirida en el hospital (n=25, 56,8 %), y el principal foco infeccioso fueron los tejidos blandos. Dados estos resultados, es necesario adelantar estudios para establecer la prevalencia de infecciones por SAMR en la piel.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; bacteriemia; infecciones de los tejidos blandos; resistencia a medicamentos; personal militar

Characterization of patients with bacteremia by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a high-complexity military hospital

Introduction: In Colombia, there are about 500,000 members in the national armed forces who consult military health institutions. In this population, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has become a high-incidence pathogen.

Objective: The aim of this study was to characterize patients with MRSA bacteremia in the Hospital Militar Central between 2012 and 2015.

Materials and methods: This was an observational descriptive study with a retrospective review of clinical histories of hospitalized patients older than 18 years of age with positive blood cultures for methicillin-resistant *S. aureus*. The identification of the patients was made using the Whonet system, version 5.6.

Results: From cultures positive for *S. aureus*, 24.8% were methicillin-resistant strains, with a higher prevalence in active military personnel. A similar frequency was observed for community-acquired MRSA bacteremias and those acquired at the hospital, with the community phenotype being the most frequent in both groups. The main infectious focus related to the development of bacteremia was soft tissue, followed by pulmonary tissue. There were higher complication rates in nosocomial bacteremias; 34.9% of the patients had prolonged stays attributable to complications triggered by the bacteremia.

Conclusions: Active military personnel was the most affected population by MRSA, with a similar frequency in community-acquired and nosocomial bacteremias. The main infectious focus was soft tissue. Taking into account these data, studies that establish the prevalence of skin infections by MRSA should be carried out.

Recibido: 06/09/17

Aceptado: 29/08/18

Publicado: 03/09/18

Citación:

Náder N, Medina RI, Pescador LA, Mantilla BM, Bravo JS, Gómez CH. Caracterización de pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en un hospital militar de alta complejidad. Biomédica. 2019;39(Supl.1):86-95 <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.4072>

Correspondencia:

Juan Sebastián Bravo, Servicio de Medicina Interna, Hospital Militar Central, Transversal 3 N° 49-00, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (300) 475 9915
jbravoojeda@gmail.com

Contribución de los autores:

Todos los autores participaron en la adquisición, análisis e interpretación de datos e hicieron contribuciones sustanciales a la concepción y el diseño del manuscrito.

Financiación:

Los autores declaran no haber recibido ningún tipo de financiación para la realización del presente manuscrito.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; bacteremia; soft tissue infections; drug resistance; military personnel.

Staphylococcus aureus es conocido como responsable de una gran variedad de enfermedades con un espectro infeccioso amplio que puede ir desde afecciones cutáneas leves hasta infecciones que entrañan una amenaza para la vida, como la neumonía, la endocarditis infecciosa, el síndrome de choque tóxico, la bacteriemia y la sepsis, entre otras (1).

En Colombia, ha habido cambios en la epidemiología de *S. aureus* resistente a la meticilina (SAMR). Según informes del Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana de Bogotá (GREBO), entre el 2008 y el 2016, se apreció una tendencia sostenida a la disminución, y hoy la tasa de resistencia a oxacilina se acerca al 21,4 % en las unidades de cuidados intensivos y a 34,5 % en adultos hospitalizados. Sin embargo, los perfiles genotípicos tienen una gran variabilidad (2). Jimenez, *et al.*, demostraron la presencia de SAMR adquirido en la comunidad (*Community Acquired Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, CA-MRSA) en un estudio de corte transversal en tres instituciones de alta complejidad de Medellín, con similar frecuencia en aislamientos provenientes de la comunidad y en los de origen hospitalario (46,8 y 40,9 %, respectivamente), lo que significa una condición endémica de este patrón de resistencia fenotípico a nivel local, donde prevalece el clon relacionado USA-300 (3).

El tratamiento de las infecciones por SAMR representa un reto importante, ya que el microorganismo se ha reportado como causa común de bacteriemia adquirida en la comunidad y también asociada con la atención en la salud (4,5), lo que afecta los sistemas de salud e incrementa la incidencia y las complicaciones que, a pesar del uso de nuevos antibióticos, provocan una mortalidad cercana al 30 % (6).

Asimismo, se han descrito factores de riesgo como el aumento de la resistencia a los antibióticos, la frecuencia de cirugías invasivas, el uso de dispositivos endovasculares, la inmunosupresión (pacientes con HIV o con trasplantes, o en tratamiento contra el cáncer), la edad mayor de 65 años y el retraso en el inicio del tratamiento antibiótico apropiado (6-8). Esta alta tasa de mortalidad genera un exceso en los costos y el uso de los recursos de los sistemas de atención en salud, debido a la gran probabilidad de complicaciones que amenazan la vida (9-11).

En Colombia, hay cerca de 500.000 miembros de las Fuerzas Militares, la mayoría de ellos mujeres y hombres jóvenes, que son atendidos en los establecimientos sanitarios militares. En este grupo de pacientes, SAMR se ha convertido en un agente patógeno de gran incidencia.

En este contexto, el objetivo de este estudio fue caracterizar clínica y demográficamente a la población mayor de 18 años atendida en el Hospital Militar Central de Bogotá con diagnóstico de bacteriemia por SAMR en el periodo transcurrido entre 2012 y 2015.

Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio observacional descriptivo en el que se revisaron retrospectivamente las historias clínicas de los pacientes mayores de 18 años con hemocultivos positivos para *S. aureus*.

Lugar

Los pacientes estuvieron hospitalizados en un hospital militar de alta complejidad de Bogotá, con una capacidad de 520 camas, para la población militar y sus familiares. En el hospital se atienden, aproximadamente, 37.000 consultas externas, 8.000 pacientes de urgencias y se hacen 1.500 cirugías mensualmente.

Selección de pacientes

Mediante la consulta de la base de datos de microbiología con el programa Whonet, versión 5.6, y utilizando las normas de *The Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2016, se revisaron las historias clínicas y se seleccionaron aquellos 177 pacientes con hemocultivos positivos para SAMR en el periodo comprendido entre 2012 y 2015.

Se excluyeron aquellos pacientes con hospitalizaciones durante la semana anterior y hasta 48 horas antes del inicio de los síntomas en instituciones diferentes al Hospital Militar. Una vez obtenidos los datos, se analizaron los resultados y se describieron las características demográficas y clínicas de la población.

Definiciones

Bacteriemia adquirida en la comunidad: pacientes con un primer hemocultivo positivo desde su ingreso y hasta 48 horas después, que no cumplieran con alguno de los siguientes criterios: residencia en un hogar geriátrico o centro de cuidados a largo plazo, necesidad de hemodiálisis crónica, tratamiento intravenoso domiciliario, presencia de dispositivos intravasculares a largo plazo y procedimiento invasivo con necesidad de hospitalización en los 90 días anteriores.

Bacteriemia adquirida en el hospital: aquellos pacientes con un primer hemocultivo positivo después de dos días de su hospitalización.

Presencia de catéter central: uso del dispositivo desde 48 horas antes del inicio de los síntomas.

Exposición a antibióticos: uso de antibióticos en los 90 días previos al diagnóstico de bacteriemia.

Fenotipo comunitario (CA-MRSA): según Popovich, *et al.* (12), se trata de un aislamiento de *S. aureus* resistente a la meticilina, condición establecida mediante una regla de predicción que se correlaciona con la sensibilidad a la clindamicina, 95 % (especificidad=80 %; LR (*likelihood ratio*)=4,86; IC_{95%} 3,29-6,47) y sensibilidad a la ciprofloxacina, 73 % (especificidad=86 %; LR=5,34; IC_{95%} 2,91-10,58). Si, además, se presenta en un aislamiento en las primeras 72 horas de hospitalización, no se conoce el índice de probabilidad; en su lugar, se estima el *likelihood ratio* a (LR=10,08).

Análisis

Se calcularon los porcentajes de las variables cualitativas y las medidas de tendencia central, con sus respectivas medidas de dispersión para las variables cuantitativas. Los resultados se obtuvieron utilizando el paquete estadístico Stata 12™.

Consideraciones éticas

Por la naturaleza retrospectiva del estudio, así como por no haberse hecho ninguna intervención en los pacientes, este se considera un estudio sin riesgo. Se garantizó la confidencialidad de los datos clínicos de los pacientes en cumplimiento del Artículo 11 de la Resolución 8430 de 1993 expedida por el Ministerio de Salud. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Militar.

Resultados

Se revisaron las historias clínicas de 177 pacientes con hemocultivos positivos para *S. aureus*, de los cuales 44 presentaron bacteriemia por SAMR. Se asignan los porcentajes para facilitar la evaluación e interpretación de los resultados. La edad promedio fue de 49 ± 23 años, la mayoría (n=30, 68,1 %) eran hombres. En cuanto a la ocupación, 20 (45,4 %) eran militares activos, 9 (20,4 %) eran retirados y 15 (34,1 %) eran civiles.

Con respecto a la caracterización de SAMR, 56,8 % (n=25) de los pacientes presentó bacteriemias adquiridas en el ámbito hospitalario, el restante 43,1 % (n=19) las habían contraído en la comunidad. Según el perfil de resistencia de SAMR aislados en 44 de los hemocultivos, 37 (84,1 %), correspondían al fenotipo de la comunidad (CA-MRSA) y 7 (15,9 %), al fenotipo hospitalario (*Hospital Acquired Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*, HA-MRSA). El fenotipo CA-MRSA se encontró en 78,9 % (n=15) de las bacteriemias originadas en la comunidad y en 88 % (n=22) de las hospitalarias, en tanto que el fenotipo HA-MRSA se encontró en 21 % (n=4) de las bacteriemias originadas en la comunidad y en 12 % (n=3) de las de origen hospitalario.

Entre las variables asociadas con la bacteriemia, se incluyeron la duración de la hospitalización desde el momento de la infección, definida como el número de días transcurrido hasta la toma de los hemocultivos. Se halló una mediana de 9 días, con un mínimo de 0 y un máximo de 80 días. En cuanto al origen de la bacteriemia por SAMR, se encontró que 18 (40,9 %) se relacionaba con la sepsis de tejidos blandos, seguida por la neumonía, con 25 % (n=11) de los casos.

En la figura 1 se presenta la distribución según el foco de infección y su lugar de origen, comunidad u hospital. Entre los militares activos, el foco de infección fue más frecuente en los tejidos blandos, seguidos del tejido pulmonar (neumonía) (figura 2).

De los pacientes diagnóstico de bacteriemia por SAMR, el 27,2 % (n=12) tuvo exposición previa a antibióticos, principalmente a carbapenémicos (n=7, 9,1 %), seguidos de penicilina (n=4, 6,8 %), cefalosporinas, vancomicina y quinolonas, con el 2,22 % (n=2) cada uno. Se encontró que 25 pacientes (56,8 %) presentaron algún tipo de comorbilidad. Se detectó inmunosupresión en 15,6 % (n=4): 9,0 % (n=2) por quimioterapia y, por uso de corticoides, HIV o neutropenia, cada uno con el 2,2 % (n=1), diabetes mellitus en 20,4 % (n=5), neoplasia hematológica en 6,8 % (n=3), tumor sólido en 13,6 % (n=3) e insuficiencia renal (sin terapia de reemplazo) en 18,2 % (n=4). El 47,7 % (n=21) de los pacientes presentaron complicaciones y, de este porcentaje, en 61 % (n=13) las bacteriemias se habían adquirido en el ámbito hospitalario.

En 38 % (n=8) de los casos de bacteriemia adquirida en la comunidad se presentaron complicaciones como falla orgánica multisistémica (20,4 % (n=2)), choque séptico (30,4 % (n=3)), paro cardiorrespiratorio (15,9 % (n=3)), falla respiratoria (22,7 % (n=2)) o falla renal aguda (29,5 % (n=3)); en

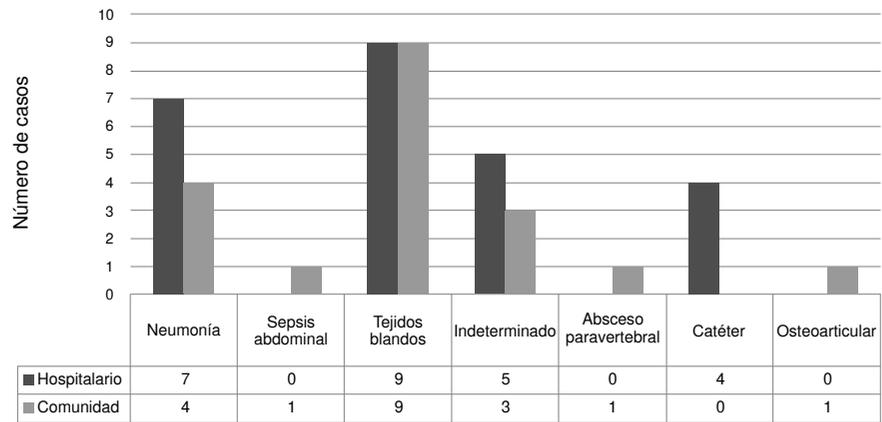


Figura 1. Distribución de los focos de infección primaria asociados con la bacteriemia según sitio de adquisición

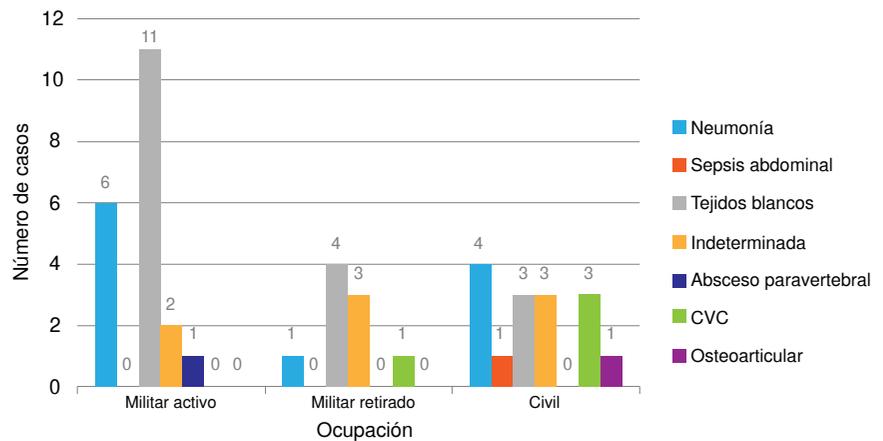


Figura 2. Distribución de focos de infección primaria asociados con la bacteriemia según la profesión

29,5 % (n=3) de los casos, la bacteriemia los condujo a la muerte. En cuatro individuos (9,1 %), se diagnosticó fascitis necrosante y embolia séptica.

La mortalidad fue mayor en el grupo con bacteriemia por SAMR de origen hospitalario que en el de la adquirida en la comunidad (40 % Vs. 15,8 %) [(n=10) Vs. (n=3)]. En el análisis por subgrupos de fenotipo, se encontró una mortalidad de 42,8 % (n=3) por HA-MRSA, en tanto que, por CA-MRSA, fue de 27 % (n=10).

Por último, en cuanto a la estancia hospitalaria, se encontró que esta fue prolongada en 34,9 % (n=15) de los casos y que podía atribuirse a la bacteriemia por SAMR, con un promedio de $36,9 \pm 14,6$ días; los porcentajes fueron similares entre los pacientes con bacteriemia adquirida en la comunidad y aquellos que la adquirieron en el ámbito hospitalario, 31,5 % (n=6) y 36 % (n=9), respectivamente.

Discusión

En este estudio, se caracterizó un grupo de pacientes con diagnóstico de bacteriemia por hemocultivos positivos para SAMR. En la revisión de Aiello, *et al.* (13) de estudios en dos grupos de alto riesgo, presos y

militares, en que se evaluaban la prevalencia y los factores de riesgo de la infección por SAMR, los autores incluyeron el estar en la cárcel, el sexo, las comorbilidades, la infección previa de la piel y el uso previo de antibióticos.

Aunque características como la higiene, el contacto físico y el hacinamiento se han postulado como factores de riesgo para la infección por SAMR, hubo pocos estudios epidemiológicos que respaldaran dicho planteamiento. La mayoría de los estudios encontrados tenía un diseño retrospectivo y solo en uno se recurrió a la vigilancia prospectiva para la colonización de SAMR en todos los individuos que residían en un solo entorno militar. En otros países, se han reportado casos en la población militar (14-23). No obstante, en nuestro país no hay información estadística en este sentido hasta la fecha.

Del total de hemocultivos positivos ($n=177$) para *S. aureus*, el 24,8 % ($n=44$) correspondía a SAMR, hallazgo que discrepa con lo reportado en otras latitudes con prevalencias de hasta de 59,2 %, por ejemplo, en los Estados Unidos (5). En el presente estudio, se encontró que la frecuencia de bacteriemia por SAMR adquirida en la comunidad era similar a la de la adquirida en el hospital, con 43,1 % ($n=19$) y 56,8 % ($n=25$), respectivamente; en tanto que, en otros reportes, se registra un aumento en la incidencia progresiva de las infecciones por SAMR adquiridas en la comunidad (24-28).

Una de las limitaciones de este estudio consistió en que no se disponía de confirmación genotípica para el subtipo SCCmec de SAMR, responsable de la resistente a la meticilina. Sin embargo, se hizo una caracterización fenotípica basada en el perfil de resistencia en el antibiograma, y se observó una alta prevalencia (84,1 %, $n=37$) de cepas con fenotipo CA-MRSA, tanto en la bacteriemia adquirida en la comunidad como en la hospitalaria. El fenotipo HA-MRSA se relacionó con una mayor mortalidad, semejante a lo documentado en otros estudios.

En diversos estudios, se ha comparado la eficacia de las técnicas de laboratorio convencionales y de las moleculares en la identificación de SAMR. Los resultados han demostrado una equivalencia de 90 a 95 % entre las diferentes series reportadas, lo que inclina la balanza a favor de la detección mediante pruebas convencionales que, en términos de costo-efectividad, superan a las herramientas moleculares. Sin embargo, estas son necesarias para identificar clones en los estudios epidemiológicos (29-31).

En su estudio, Wang, *et al.*, determinaron los factores de riesgo asociados con la mortalidad en las bacteriemias por SAMR y, mediante genotipificación del subtipo SSCmec, encontraron una adecuada correlación entre el patrón fenotípico de resistencia y el genotipo de SAMR (1). En este estudio, se observó una mortalidad similar a los 14 y a los 30 días con el subtipo HA-MRSA.

En el presente estudio, los tejidos blandos fueron el foco de infección más frecuentemente relacionado con el desarrollo de bacteriemia por SAMR, seguido del pulmonar (figura 1). En el estudio de Laupland, *et al.*, los principales focos infecciosos se localizaron en las zonas pélvica y en la abdominal (25 %), el aparato respiratorio (16 %), y los tejidos blandos (10 %), así como los debidos a intervenciones endovasculares (8 %) o los huesos y articulaciones (7 %) (15). Aunque en ambos estudios la mayoría de los focos de infección primaria fueron los mismos, se registraron diferencias en cuanto a la frecuencia de presentación, lo cual podría tener relación

con el tipo de población evaluada, ya que, en el presente estudio, la mayor frecuencia se registró en pacientes militares activos, personal que está expuesto a las lesiones de piel.

La bacteriemia asociada con el uso de catéter venoso central en la población aquí estudiada, se presentó en 9,09 % (n=4) de los pacientes y representó el 16 % (n=4) de las bacteriemias por SAMR de origen hospitalario, en tanto que, en la literatura médica, se han reportado casos hasta en el 39 % (16).

En 56,82 % (n=25) de la población estudiada, se encontró algún tipo de comorbilidad en el momento del ingreso al hospital, como diabetes mellitus (20,45 %) (n=5), inmunosupresión farmacológica (15,6 %) (n=4) por quimioterapia o por uso crónico de corticoides, e insuficiencia renal (9 %) (n=2). El 44 % de estos pacientes tuvo complicaciones relacionadas con la bacteriemia durante su estancia hospitalaria; las más frecuentes fueron la falla orgánica multisistémica y la insuficiencia renal aguda, además de los casos de muerte. Estos hallazgos se asemejan a los reportados en la literatura médica, siendo las comorbilidades de mayor impacto la enfermedad renal, los tumores sólidos, la diabetes mellitus con uso de insulina y el HIV (5,14).

Según las guías para el manejo y seguimiento de los pacientes con bacteriemia por SAMR (14), se deben hacer hemocultivos a las 48 y las 72 horas de inicio del tratamiento antibiótico, así como ecocardiografía para determinar la gravedad de la bacteriemia, establecer la duración del tratamiento antibiótico y determinar la presencia de endocarditis infecciosa (3,5,14,17). Es necesario optimizar el cumplimiento de estas guías de manejo.

Todos los pacientes evaluados recibieron tratamiento antibiótico empírico y, en 79,5 % (n=35) de la población con actividad contra SAMR, se administró tratamiento con un solo antibiótico o combinado con otros, siendo la vancomicina el más utilizado. Una vez se obtuvo la tipificación del microorganismo y se confirmó la presencia de SAMR en los hemocultivos, el antibiótico más utilizado continuó siendo la vancomicina, en 50 % (n=22) de los casos. Sin embargo, llamó la atención el uso del tratamiento combinado (40,90 %) (n=16), siendo la combinación de un betalactámico y la vancomicina (15,91 %) (n=7) la más frecuente, lo que podría generar mayores costos y complicaciones derivadas del uso inadecuado de estos medicamentos.

Estos hallazgos justifican la implementación de un programa de uso prudente de los antibióticos, que hoy hace parte de las estrategias institucionales de control de las infecciones.

Los medicamentos de primera línea aprobados por la *US Food and Drug Administration* (FDA) para la bacteriemia por SAMR, son la vancomicina y la daptomicina, y la utilización de una u otra se decide según la concentración mínima inhibitoria de la vancomicina. En varios estudios se ha sugerido la utilización de la daptomicina ante la presencia de altas concentraciones mínimas inhibitorias de la vancomicina. El trimetropim-sulfametoxazol y el linezolid pueden ser útiles cuando han fallado los antibióticos de primera línea.

Asimismo, se recomienda que todos los pacientes sean tratados por vía intravenosa (17). Recientemente, se ha querido comparar la eficacia entre el manejo entérico y el parenteral (32). El estudio SABATO, actualmente en curso, aún no arroja reportes definitivos; su principal objetivo es demostrar que, en pacientes con bacteriemia por *S. aureus* de bajo riesgo, el cambio del tratamiento antimicrobiano intravenoso al oral no reduce la eficacia contra la infección (33).

Los sesgos posibles del presente estudio incluyen el no haber hecho la identificación genotípica y la evaluación de la mortalidad atribuible al aislamiento comparada con el peso de las comorbilidades y su gravedad.

Aproximadamente, el 24,8 % (n=44) de los aislamientos de *S. aureus* en hemocultivos correspondían a SAMR en la población de estudio, y se registró una frecuencia similar entre las bacteriemias adquiridas en la comunidad y las adquiridas en el ámbito hospitalario.

En este estudio, se encontró que los militares activos fueron los más afectados por este microorganismo, y el principal foco infeccioso fueron los tejidos blandos. Se necesitan estudios posteriores que permitan determinar la prevalencia de SAMR como causa de infección de los tejidos blandos para, así, evaluar la necesidad de establecer protocolos que incluyan fármacos de primera línea en el tratamiento antibiótico empírico (vancomicina o daptomicina) de las bacteriemias por SAMR en este contexto.

La frecuencia de la bacteriemia por SAMR asociada con el uso de catéter central fue baja (9%, n=4) en nuestra población. Se presentó un 61 % (n=13) de complicaciones en la bacteriemia de origen hospitalario, siendo la más frecuente la falla orgánica multisistémica.

El fenotipo CA-MRSA representó la causa más frecuente (80,4 %, n=37) de bacteriemia en el Hospital Militar, con prevalencia del fenotipo HA-MRSA. Sin embargo, se requieren estudios que verifiquen los genotipos para corroborar este dato.

El seguimiento de los pacientes con diagnóstico de bacteriemia por SAMR fue deficiente y, aunque no se contempló como una variable del estudio, se pudo observar que es necesario implementar estrategias de uso prudente de los antibióticos, así como evaluar su cumplimiento. El tratamiento antibiótico combinado utilizado de forma empírica debe evaluarse en el momento de la confirmación microbiológica de SAMR, ya que puede generar mayores costos innecesarios.

Referencias

1. Wang JT, Wang JL, Fang CT, Chie WC, Lai MS, Lauderdale TL, *et al.* Risk factors for mortality of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bloodstream infection: With investigation of the potential role of community-associated MRSA strains. *J Infect.* 2010;61:449-57. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.09.029>
2. Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana de Bogotá (GREBO). Resultados de la vigilancia de la resistencia bacteriana, año 2016. Componente pediátrico y adulto. Análisis de percentiles marcadores de resistencia 2016. Tendencias de los principales marcadores de resistencia, 2008-2016. *Boletín GREBO.* 2017;9:1-23.
3. Jiménez JN, Ocampo AM, Vanegas JM, Rodríguez EA, Mediavilla JR, Chen L, *et al.* A comparison of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* reveals no clinical and epidemiological but molecular differences. *Int J Med Microbiol.* 2013;303:76-83. <https://doi.org/10.1016/j.jimm.2012.12.003>
4. Gasch O, Camoez M, Domínguez MA, Padilla B, Pintado V, Almirante B, *et al.* Predictive factors for mortality in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: Impact on outcome of host, microorganism and therapy. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:1049-57. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12108>
5. Naber CK. *Staphylococcus aureus* bacteremia: Epidemiology, pathophysiology, and management strategies. *Clin Infect Dis.* 2009;48(Suppl.4):S231-7. <https://doi.org/10.1086/598189>
6. Chong YP, Park S, Kim HS, Kim ES, Kim M, Park K, *et al.* Persistent *Staphylococcus aureus* bacteremia, a prospective analysis of risk factors, outcomes and microbiologic and genotypic characteristics of isolates. *Medicine (Baltimore).* 2013;92:98-108. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e318289ff1e>

7. Lam SW, Bauer SR, Neuner EA. Predictors of septic shock in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Int J Infect Dis.* 2012;16:e453-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.02.007>
8. Taylor AR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Prim Care.* 2008;16:637-54. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2013.06.002>
9. Pastagia M, Kleinman LC, Lacerda EG, Cruz D, Jenkins SG. Predicting risk for death from MRSA bacteremia. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1072-80. <https://doi.org/10.3201/eid1807.101371>
10. Corey GR. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: Definitions and treatment. *Clin Infect Dis.* 2009;27715(Suppl.4):S254-9. <https://doi.org/10.1086/598186.11>
11. Naves SK, Vaz N, Pinto P, Filho G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: Risk factors and clinical outcome in non-intensive-care units. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45:189-93. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000200010>
12. Popovich K, Hota B, Rice T, Aroutcheva A, Weinstein RA. Phenotypic prediction rule for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2293-5. <https://doi.org/10.1128/JCM.00044-07>
13. Aiello A, Lowy E, Wright FD, Larson L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among US prisoners and military personnel: Review and recommendations for future studies. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:335-41. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70491-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70491-1)
14. Zinderman C, Conner B, Malakooti M, LaMar J, Armstrong A, Bohnker B. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among military recruits. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:941-4. <https://doi.org/10.3201/eid1005.030604>
15. Washington MA, Agee WA 3rd, Kajiura L, Staeger CM, Uyehara CF, Barnhill JC. An analysis of *Staphylococcus aureus* infections at a military medical center using the PLEX-ID combined polymerase chain reaction-mass spectrometry system. *Mil Med.* 2014;179:445-50. <https://doi.org/10.7205/MILMED-D-13-00472>
16. Vento T, Calvano T, Cole D, Mende K, Rini E, Tully CH, *et al.* *Staphylococcus aureus* colonization of healthy military service members in the United States and Afghanistan. *BMC Infect Dis.* 2013;13:325. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-325>
17. Hospenthal D, Green A, Crouch H, English J, Pool J, Yun H, *et al.* Infection prevention and control in deployed military medical treatment facilities. *J Trauma.* 2011;71:S290-8. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e318227add8>
18. Braun L, Craft D, Williams R, Tuamokumo F, Ottolini M. Increasing clindamycin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 57 Northeast United States Military treatment facilities. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24:622-6. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e318227add8>
19. Landrum M, Neumann CH, Cook C, Chukwuma U, Ellis M, Hospenthal D, *et al.* Epidemiology of *Staphylococcus aureus* blood and skin and soft tissue infections in the US Military Health System, 2005-2010. *JAMA.* 2012;308:50-9. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.7139>
20. Roberts S, Kazragis R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in U.S. service members deployed to Iraq. *Mil Med.* 2009;174:408.
21. Sherwood J, Park M, Robben P, Whitman T, Ellis M. USA 300 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerging as a cause of bloodstream infections at military medical centers. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34:393-9. <https://doi.org/10.1086/669866>
22. Whitman TJ, Herlihy RK, Schlett CD, Murray P. Chlorhexidine-impregnated cloths to prevent skin and soft-tissue infection in marine recruits: A cluster-randomized, double-blind, controlled effectiveness trial. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010;31:1207-15. <https://doi.org/10.1086/657136>
23. Ganesan A, Crawford K, Mende K, Murray C, Lloyd B, Ellis M, *et al.* Evaluation for a novel methicillin resistance (*mecC*) homologue in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained from injured military personnel. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3073-5. <https://doi.org/10.1128/JCM.01516-13>
24. Paul M, Kariv G, Goldberg E, Raskin M, Shaked H, Hazzan R, *et al.* Importance of appropriate empirical antibiotic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother.* 2010;2658-65. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq373>
25. Laupland KB, Ross T, Gregson DB. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: Risk factors, outcomes, and the influence of methicillin resistance in Calgary, Canada, 2000-2006. *J Infect Dis.* 2008;198:336-43. <https://doi.org/10.1086/589717>

26. Arias-Ortiz PM, del Pilar-Calderón L, Castillo JS. Factores de riesgo de la resistencia a meticilina de *Staphylococcus aureus* causante de bacteriemia: Un estudio multicéntrico de casos y controles emparejados. *Biomédica*. 2016;36:612-8. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i4.3193>
27. Holland TL, Arnold C, Fowler VG. Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *JAMA*. 2014;312:1330. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.9743>
28. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): Guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:4961-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.00579-09>
29. Wang WY, Chiueh TS, Sun JR, Tsao SM, Lu JJ. Molecular typing and phenotype characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from blood in Taiwan. *PLoS One*. 2012;7:e30394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030394>
30. Gradelski E, Valera L, Aleksunes A, Bonner D, Fung-Tomc J. Correlation between genotype and phenotypic categorization of *Staphylococci* based on methicillin susceptibility and resistance. *J Clin Microbiol*. 2001;39: 2961-3. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2961-2963.2001>
31. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI Guidelines. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement to CLSI Approved Standard M2-A8, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Wayne, PA: CLSI; 2016.
32. López-Cortés LE, de Cueto M, Rodríguez-Baño J. How should we best treat patients with bloodstream infections? *Future Microbiol*. 2017;12:927-30. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0118>
33. Kaasch A, Fätkenheuer G, Prinz-Langenohl R, Paulus U, Hellmich M, Wei V, *et al*. Early oral switch therapy in low-risk *Staphylococcus aureus* bloodstream infection (SABATO): Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2015;16:450. <https://doi.org/10.1186/s13063-015-0973-x>

Original article

Multidrug resistance and risk factors associated with community-acquired urinary tract infections caused by *Escherichia coli* in Venezuela

Militza Guzmán¹, Elsa Salazar¹, Vicmaris Cordero¹, Ana Castro¹, Andreína Villanueva¹, Hectorina Rodulfo^{2,3}, Marcos De Donato^{2,3}

¹ Laboratorio de Bacteriología Molecular, Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela

² Laboratorio de Genética Molecular, Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas Dra. Susan Tai (IIBCAUDO) Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela

³ Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Querétaro, México

Introduction: The treatment of urinary tract infections has become more challenging due to the increasing frequency of multidrug-resistant *Escherichia coli* in human populations.

Objective: To characterize multidrug-resistant *E. coli* isolates causing community-acquired urinary tract infections in Cumaná, Venezuela, and associate possible risk factors for infection by extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing isolates.

Materials and methods: We included all the patients with urinary tract infections attending the urology outpatient consultation and emergency unit in the *Hospital de Cumaná*, Estado Sucre, Venezuela, from January through June, 2014. *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} genes detection was carried out by PCR.

Results: We found a high prevalence of multidrug-resistant *E. coli* (25.2%) with 20.4% of the isolates producing ESBL. The ESBL-producing isolates showed a high frequency (66.7%) of simultaneous resistance to trimethoprim-sulphamethoxazole, fluoroquinolones and aminoglycosides compared to non-producing isolates (2.4%). Of the resistant isolates, 65.4% carried the *bla*_{TEM} gene, 34.6% the *bla*_{CTX-M} and 23.1% the *bla*_{SHV}. The *bla*_{CTX-M} genes detected belonged to the CTX-M-1 and CTX-M-2 groups. Plasmid transfer was demonstrated by *in vitro* conjugation in 17 of the 26 ESBL-producing isolates. All three genes detected were transferred to the transconjugants. Age over 60 years, complicated urinary tract infections and previous use of a catheter predisposed patients to infection by ESBL-producing *E. coli*.

Conclusions: The high frequency of multidrug-resistant ESBL-producing isolates should alert the regional health authorities to take measures to reduce the risk of outbreaks caused by these types of bacteria in the community.

Keywords: *Escherichia coli*; urologic diseases; beta-lactamases; drug resistance, bacterial; community-acquired infections.

Multirresistencia a medicamentos y factores de riesgo asociados con infecciones urinarias por *Escherichia coli* adquiridas en la comunidad, Venezuela

Introducción. El tratamiento de las infecciones urinarias constituye un reto creciente por el aumento de *Escherichia coli* proveniente de la comunidad multirresistente a los medicamentos.

Objetivo. Caracterizar aislamientos de *E. coli* multirresistente causantes de infecciones urinarias adquiridas en la comunidad en Cumaná, Venezuela, y detectar los posibles riesgos de infección por aislamientos productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

Materiales y métodos. Se incluyeron todos los pacientes atendidos en la consulta externa de urología y en urgencias del Hospital de Cumaná entre enero y junio de 2014 y que evidenciaban infecciones urinarias. La detección de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} se hizo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Resultados. Se encontró una alta prevalencia de *E. coli* multirresistente a los medicamentos (25,2 %), con 20,4 % de aislamientos productores de BLEE y una gran frecuencia de resistencia simultánea a trimetoprim-sulfametoxazol, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (66,7 %) comparados con los no productores (2,4 %). En el 65,4 % de los aislamientos resistentes, se encontró el gen *bla*_{TEM}; en 34,6 %, el *bla*_{CTX-M} y en 23,1 %, el *bla*_{SHV}. Los genes *bla*_{CTX-M} detectados pertenecían a los grupos CTX-M-1 y CTX-M-2. Se demostró la transferencia *in vitro* de plásmidos por conjugación en 17 de los 26 aislamientos productores de BLEE. Los tres tipos de genes detectados se transfirieron a los transconjugantes. La edad mayor de 60 años, las infecciones urinarias con complicaciones y el uso previo de catéter, predispusieron a la infección por cepas de *E. coli* productoras de BLEE.

Received: 22/08/17

Accepted: 31/08/18

Published: 04/09/18

Citation:

Guzmán M, Salazar E, Cordero V, Castro A, Villanueva A, Rodulfo H, De Donato M. Multidrug resistance and risk factors associated with community-acquired urinary tract infections caused by *Escherichia coli* in Venezuela. *Biomédica*. 2019;39(Supl.1):96-106
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.4030>

Corresponding author:

Marcos De Donato, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Tecnológico de Monterrey, Avenida Epigmenio Gonzalez 500, Querétaro, México, 76130
Telephone: (+52) (442) 238 3100
mdedonate@itesm.mx

Author contributions:

Militza Guzmán, Elsa Salazar: experiment design, strains identification, and antimicrobial assays.
Vicmaris Cordero, Ana Castro: collection of samples and epidemiological data, strains identification, antimicrobial assays.
Militza Guzmán, Andreína Villanueva, Hectorina Rodulfo, Marcos De Donato: molecular analyses.
Militza Guzmán, Marcos De Donato: data analysis, manuscript writing

Funding:

The authors would like to thank the *Consejo de Investigaciones de la Universidad de Oriente* for funding and supporting this project (number: CI-2-040102-1409/08).

Conflicts of interest

None of the authors report any conflicts of interest.

Conclusiones. La gran frecuencia de aislamientos multirresistentes productores de BLEE debería alertar a las autoridades sanitarias para tomar medidas que reduzcan el riesgo de epidemias causadas por este tipo de bacterias en la comunidad.

Palabras clave: *Escherichia coli*; enfermedades urológicas; beta-lactamasas; farmacorresistencia bacteriana; infecciones comunitarias adquiridas.

Urinary tract infections affect people of all ages and are one of the most frequently treated pathologies in primary healthcare centers. Although urinary infections can be caused by several species in the Enterobacteriaceae, most cases (both community and hospital-acquired) are produced by *E. coli* (1,2). Infection rates by extended-spectrum β -lactamases (ESBL)-producing *E. coli* have increased in the last 10 years in Latin America, with some regions showing prevalences of up to 32%. In addition, 11 to 25% of these ESBL-producing *E. coli* infections are now resistant to third generation cephalosporins including important rates of multidrug resistance, and only the antibiotics carbapenems, tigecycline and colistin are showing susceptibility rates >90% (3).

ESBL-producing strains are also often resistant to antibiotics of other classes (sulfonamides, aminoglycosides, quinolones) thus complicating treatment strategies. The screening of ESBL-producing bacteria by antibiotic susceptibility testing is challenging, hence detection of specific genes by PCR is commonly used for final confirmation. The most common ESBL are the SHV, TEM, and CTX-M types, and the association of these three types of enzymes with *E. coli* infections has been investigated in many studies. CTX-M-type enzymes have been shown to be the most prevalent ESBL (4) and have been associated with numerous outbreaks of infections both in hospitals and in the community, and particularly, along with the SHV and TEM types, in urinary *E. coli* strains isolated from nonhospital settings (5). This has resulted in a change in epidemiological patterns with ESBL-producing strains appearing outside the hospital environment, thus converting them into an emerging public health problem (2,6). The frequencies of ESBL found in South America rank amongst the highest in the world with CTX-M dominant possibly due to poorer social and economic situations, hospital overcrowding, lack of antimicrobial stewardship, excessive over-the-counter antibiotic usage, and under-supported infection control practices (6).

In Venezuela, there are several reports of infections by ESBL-producing Enterobacteriaceae species from Caracas (7), Cumaná (8), Ciudad Bolívar (9) and Mérida (10), and the reports from Ciudad Bolívar and Mérida also describe ESBL-producing isolates detected from communities. In this context and given the increasing probability of dissemination of ESBL-producing strains in the community, the aim of the present study was to characterize multidrug-resistant *E. coli* isolates causing community-acquired urinary tract infections and the risk factors associated with the presence of ESBL in Cumaná, Venezuela.

Materials and methods

Bacterial isolates and patients

We evaluated a total of 103 *E. coli* isolates from patients attending the urology outpatient consultation and the emergency unit from January 1st through June 30th, 2014, at the *Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá"* in Cumaná, Estado Sucre, Venezuela. Urine samples from patients from both genders (20 males and 83 females) and different

ages (ranging from 12 to 70 years) who showed urinary tract infection symptoms and indications for urine culture were examined for isolates. All patients were diagnosed with community-acquired urinary tract infection defined as previously suggested (11) as having abundant bacteria and polymorphonuclear leukocytes in the urine sample and positive urine culture with bacterial counts equal to or greater than 10^3 CFU/ml of urine when *E. coli* was identified. The urinary tract infections were classified as complicated or uncomplicated according to the guidelines established by the Infectious Diseases Society of America (12).

A community-acquired infection was defined according to the criteria proposed by Friedman, *et al.* (13), differentiating it from healthcare-associated infections and hospital-acquired infections, like an infection present at the moment of the consultation and when patients had not received any of the following: intravenous therapy at home, wound care or specialized nursing care administered by a healthcare agency, close family or friends, and self-administered intravenous medical therapy in the 30 days before the infection as well as those patients that did not attend a hospital or hemodialysis clinic, or received intravenous chemotherapy in the previous 30 days, or had been hospitalized in an acute care hospital for two or more days in the previous 90 days, or resided in a nursing home or long-term care facility.

Microbial susceptibility tests and detection of ESBL

Antimicrobial susceptibility and interpretation were evaluated using the disk diffusion susceptibility test according to the Clinical Laboratory Standards Institute (14). The antimicrobials tested (Oxoid Ltd., UK) were ampicillin (10 µg), cefalotin (30 µg), cefoxitin (30 µg), cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), cefepime (30 µg), aztreonam (30 µg), piperacillin-tazobactam (100/10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (30 µg), ampicillin-sulbactam (10/10 µg) amoxicillin-clavulanic acid (2:1) (30 µg), nalidixic acid (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), amikacin (30 µg), tobramycin (10 µg) and trimethoprim-sulfamethoxazole (25 µg).

ESBL phenotypes were confirmed using the combined disc method (14) using *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 700603 as the control strains. Multidrug resistance was defined as those isolates that showed resistance to ≥ 1 agents in ≥ 3 antimicrobial categories according to the consensus of a group of international experts (15).

Detection of the genes coding for β -lactamases

DNA was isolated by extraction using the Wizard Genomic purification kitTM (Promega). Resistant genes were identified by means of a PCR assay for *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} using the primers described elsewhere (16-18). The PCR products were electrophoresed in 2% agarose gel and stained with GelRed Nucleic Acid StainTM (Biotium). A 100 bp DNA ladder (Fermentas, Lithuania) was used as the molecular weight marker.

Transfer of resistance

Conjugation assays were done in a solid medium using *E. coli* j62-2 (resistant to rifampicin, CVCM 131) as the recipient (7). The clinical and recipient strains were grown separately in Luria-Bertani broth (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA, USA) at 37°C for 18 hours, and then mixed in a ratio of 1:4 (clinical isolates: recipient). Transconjugants were selected on MacConkey agar containing 100 µg rifampicin and 2 µg cefalotin.

Differentiation of the CTX-M group by PCR-RFLP

Restriction enzyme digestion was carried out according to Mahboobeh (19). The members of the CTX-M group were identified according to the fragments generated by double digestion by the *Pst*I and *Pvu*II enzymes. *E. coli* 2944NR was used as an RFLP positive control since it contains a CTX-M-1 type β -lactamase while *E. coli* J62-2 was used as a negative control. The RFLP products were observed in a 2% agarose gel containing GelRedNucleic Acid Stain™ (Biotium).

Statistical analyses

The risk factors considered in this study were: Nasogastric tube use, Foley catheter use, chronic kidney disease, cerebral vascular accident, bedridden, immunosuppression treatment, pregnancy, presence of any functional or structural urinary abnormality, diagnosis of a urinary tract infection within one year, antimicrobial treatment within three months, hospitalization within the previous three months but not within the previous 30 days, diabetes, and age over 60.

The risk factors associated with infection by an ESBL-producing *E. coli* isolate were determined firstly by using a binary logistic regression for each variable followed by multivariate analysis for those variables showing best relevance, in which the variables were considered as predictors of ESBL.

The analysis was performed using a stepwise selection of variables, and the area under the ROC curve was calculated to determine the model's predictive ability. The statistical analyses were carried out using the statistical package for the social sciences (SPSS™, version 18, IBM Corporation).

Ethical aspects

The patients gave their written consent after they were informed of the risks and benefits of participating in the study and had answered an epidemiological questionnaire.

The treatment of the patients, the analysis of the isolates, and the information generated were conducted according to the bioethical and biosafety guidelines set out by the *Comisión de Ética, Bioética y Biodiversidad* of the *Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas «Dra. Susan Tai»* at the *Universidad de Oriente*.

Results

The *E. coli* isolates (n=103) evaluated in this study showed high rates of resistance for the antimicrobials frequently used to treat patients with urinary infections, such as ampicillin (96.1%), cefalotin (59.4%) and ampicillin-sulbactam (24.8%), amoxicillin-clavulanate (25.7%), trimethoprim-sulfamethoxazole (39.6%) and ciprofloxacin (29.7%).

The isolates from the uncomplicated urinary tract infections (30.1%) showed significantly lower resistance compared to those from complicated urinary tract infections (figure 1).

A total of 26 (25.2%) isolates were multidrug resistant (table 1), of which 21 (20.4%) showed production of ESBL. Of the 26 multidrug resistant isolates, 18 showed resistance to six or more antimicrobial categories, and the categories most associated with resistance were penicillins, cephalosporins, both with

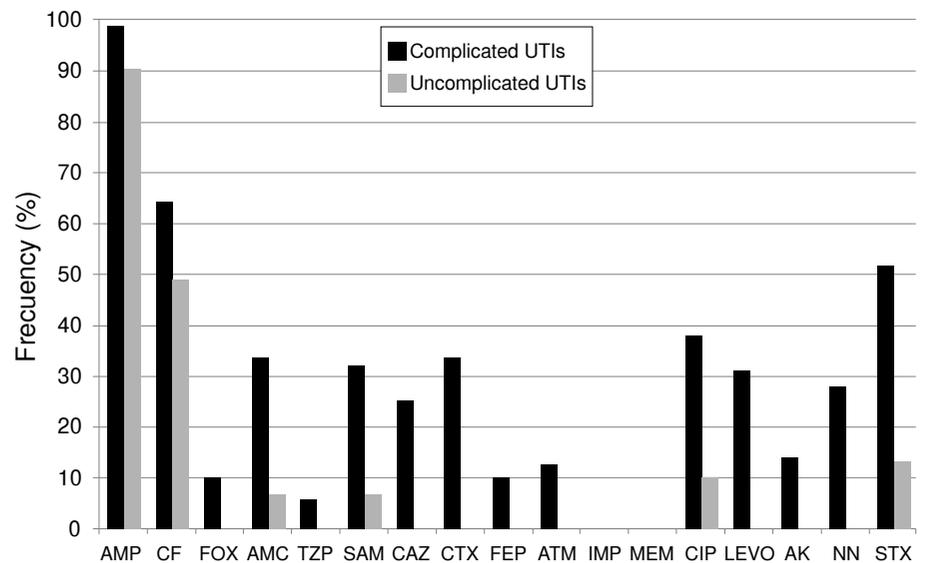


Figure 1. Frequency of resistant *Escherichia coli* isolates from patients with community-acquired urinary tract infections

AMP: Ampicillin; CF: Cefalotin; FOX: Cefoxitin; AMC: Amoxicillin-clavulanic acid; TZP: Piperacillin-tazobactam; SAM: Ampicillin-sulbactam; CAZ: Ceftazidime; CTX: Cefotaxime; FEP: Cefepime; ATM: Aztreonam; IMP: imipenem; MEM: meropenem; CIP: Ciprofloxacin; LEVO: Levofloxacin; AK: Amikacin; STX: Trimethoprim-sulfamethoxazole

Note: Isolates with intermediate resistance were classified as resistant.

and without extended-spectrum, and folate pathway inhibitors (table 1). ESBL-producing isolates also showed a high frequency (66.7%) of simultaneous resistance to trimethoprim-sulphamethoxazole, fluoroquinolones and aminoglycosides compared to non-producing isolates (2.4%).

The bla_{TEM} gene was found in 17 isolates (65.4%) while bla_{CTX-M} was detected in nine isolates (34.6%) and bla_{SHV} in six isolates (23.1%). The bla_{TEM} and bla_{SHV} genes were found in *E. coli* isolates, ESBL-producing or not, while bla_{CTX-M} was only found in ESBL-producing isolates. More than one gene was amplified in seven isolates: The most frequent combination was $bla_{TEM} + bla_{CTX-M}$ (four isolates), and a three-gene combination was found in two ESBL producing isolates (table 1). The RFLP results revealed that five of the bla_{CTX-M} genes were identified as belonging to the CTX-M-2 group and four to the CTX-M-1 group (figure 2).

Of the 26 multidrug resistant isolates resistant to third generation cephalosporins and subjected to *in vitro* bacterial conjugation, only 17 were able to transfer plasmids with resistance genes at a mean transfer rate of 10^{-7} clinical isolates-transconjugant. Phenotypic analysis of the transconjugants demonstrated that part of the resistance pattern present in the clinical isolates was also observed in the transconjugants (table 1). All of the bla_{CTX-M} genes were transferred to the transconjugant strain from the clinical isolates while only 64.7% (11/17) of the bla_{TEM} gene and 33.3% (2/6) of the bla_{SHV} were transferred (table 1). In the transconjugants of the two clinical isolates containing the three genes (204 and 339), the bla_{SHV} gene was not transferred. These results demonstrate the transmissibility of *bla* genes to other *E. coli* strains.

When analyzing the risk factors for ESBL-producing *E. coli*, we found that an age over 60 years, complicated urinary tract infection, and urinary

Table 1. Phenotypic and molecular characteristics of multidrug resistant *Escherichia coli* isolates. Here we show the DDST phenotypes of the bacterial isolates from patients with community-acquired urinary tract infections and their transconjugants, when appropriate, as well as the genes detected by PCR.

Isolates	ESBL	Resistance	Bla genes	Resistance in transconjugants	Bla genes transferred
EC14	+	AMP, CF, CAZ, CTX, STX	<i>bla</i> _{TEM}		
EC33	-	AMP, CF, FOX, CTX, ATM, CIP, LEVO, STX	<i>bla</i> _{SHV}		
EC37	-	AMP, CF, CTX, CIP, STX	-		
EC49	-	AMP, CF, AMC, CAZ, CTX, ATM, CIP, LEVO, AK, TOB, STX,	<i>bla</i> _{TEM}		
EC95	+	AMP, CF, AMC, CAZ, CTX, CIP, LEVO, STX	<i>bla</i> _{SHV}		
EC190	-	AMP, CF, CAZ, NAL, CIP, LEVO, STX	<i>bla</i> _{TEM}		
EC305	-	AMP, CF, AMC, CTX, ATM, SAM, CIP, LEVO, AK, TOB, STX	<i>bla</i> _{TEM}		
EC372	+	AMP, CF, CAZ, CTX, FEP, CIP, STX	<i>bla</i> _{TEM}		
EC918	+	AMP, CF, CAZ, CTX, FEP, CIP, LEVO	<i>bla</i> _{TEM}		
EC16	+	AMP, CF, CAZ, CTX, SAM, STX	<i>bla</i> _{TEM}	AMP, CF, CAZ, CTX, STX	<i>bla</i> TEM
EC30	+	AMP, CF, CTX, SAM, CIP, TOB, STX	<i>bla</i> _{TEM} [†] <i>bla</i> _{CTX-M}	AMP, CF, CTX, TOB, STX	<i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CTX-M
EC61	+	AMP, CF, AMC, FOX, CAZ, CTX, SAM, CIP, LEVO, AK, TOB, STX	<i>bla</i> _{TEM} [†] <i>bla</i> _{CTX-M}	AMP, CF, CTX, AK, TOB, STX	<i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CTX-M
EC78	+	AMP, CF, CTX, SAM, CIP, LEVO, TOB, STX	<i>bla</i> _{TEM}	AMP, CF, CTX, TOB, STX	<i>bla</i> TEM
EC84	+	AMP, CF, CTX, SAM, CIP, TOB, STX	<i>bla</i> _{TEM}	AMP, CF, CTX, STX	<i>bla</i> TEM
EC123	+	AMP, CF, CAZ, CTX, FEP CIP, LEVO, TOB, STX	<i>bla</i> _{SHV}	AMP, CF, CAZ, CTX, FEP, TOB, STX	<i>bla</i> SHV
EC204	+	AMP, CF, AMC, CTX, ATM, CIP, LEVO, TOB, STX	<i>bla</i> _{TEM} [†] <i>bla</i> _{SHV} [†] <i>bla</i> _{CTX-M}	AMP, CF, CTX, TOB, STX	<i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CTX-M
EC339	+	AMP, CF, AMC, FOX, CAZ, CTX, ATM, SAM, CIP, LEVO, AK, TOB, STX	<i>bla</i> _{TEM} [†] <i>bla</i> _{SHV} [†] <i>bla</i> _{CTX-M}	AMP, CF, CAZ, CTX, ATM, AK, TOB, STX	<i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CTX-M
EC347	+	AMP, CF, AMC, CAZ, CTX, FEP, SAM, CIP, LEVO, AK, TOB	<i>bla</i> _{CTX-M}	AMP, CF, CAZ, CTX, FEP, NAL, CIP, AK, TOB	<i>bla</i> CTX-M
EC348	+	AMP, CF, AMC, CAZ, CTX, FEP, SAM, CIP, LEVO, TOB, STX	<i>bla</i> _{TEM} [†] <i>bla</i> _{SHV}	AMP, CF, CAZ, CTX, FEP, TOB, STX	<i>bla</i> TEM, <i>bla</i> SHV
EC385	+	AMP, CF, AMC, FOX, CAZ, CTX, ATM, SAM, CIP, LEV, TOB	-	AMP, CF, CAZ, CTX, TOB	-
EC514	+	AMP, CF, AMC, FOX, CAZ, CTX, ATM, SAM, CIP, LEVO, TOB, STX	<i>bla</i> _{CTX-M}	AMP, CF, CAZ, CTX, ATM, TOB, STX	<i>bla</i> CTX-M
EC779	+	AMP, CF, CAZ, CIP, LEVO, STX	-	AMP, CF, CAZ	-
EC868	+	AMP, CF, AMC, CTX, CIP, LEVO, STX	<i>bla</i> _{TEM} [†] <i>bla</i> _{CTX-M}	AMP, CF, AMC, CTX	<i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CTX-M
EC876	+	AMP, CF, CAZ, CTX, PTZ, FEP, CIP, LEVO, AK, TOB, STX	<i>bla</i> _{TEM}	AMP, CF, CAZ, CTX, FEP, AK, TOB, STX	<i>bla</i> TEM
EC926	+	AMP, CF, AMC, CAZ, CTX, ATM, SAM, CIP, LEVO, AK, TOB, STX	<i>bla</i> _{TEM} [†] <i>bla</i> _{CTX-M}	AMP, CF, CAZ, CTX, NAL, CIP, AK, TOB, STX	<i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CTX-M
EC983	+	AMP, CF, AMC, CAZ, CTX, ATM, FEP, CIP, LEVO, AK, TOB, STX	<i>bla</i> _{CTX-M}	AMP, CF, CAZ, CTX, ATM, FEP, AK, TOB, STX	<i>bla</i> CTX-M

ESBL: Extended-spectrum β -lactamases; AMP: Ampicillin; CF: Cefalotin; AMC: Amoxicillin-clavulanic acid; FOX: Cefoxitin; CAZ: Ceftazidime; CTX: Cefotaxime; ATM: Aztreonam; SAM: Ampicillin-sulbactam; TZP: Piperacillin-tazobactam; FEP: Cefepime; CIP: Ciprofloxacin; LEVO: Levofloxacin; AK: Amikacin; TOB: Tobramycin; STX: Trimethoprim-sulfamethoxazole

catheterization (more than 30 days previous to the infection) predisposed patients to an infection by a multidrug resistant/ESBL-producing *E. coli* strain (table 2) with relative risks (RR) 3.1 (95% CI: 1.5-6.4), 4.1 (95% CI: 1.1-16.5), and 3.3 (95% CI: 1.6-6.8) times higher, respectively, for patients with those conditions compared to those without them.

Other risk factors, such as nasogastric tube use, cerebral vascular accident, bedridden patients, immunosuppression treatment, pregnancy, the presence of a structural urinary abnormality, and hospitalization within the previous three months were not analyzed since no ESBL-producing isolate was found in any of the patients showing these conditions.

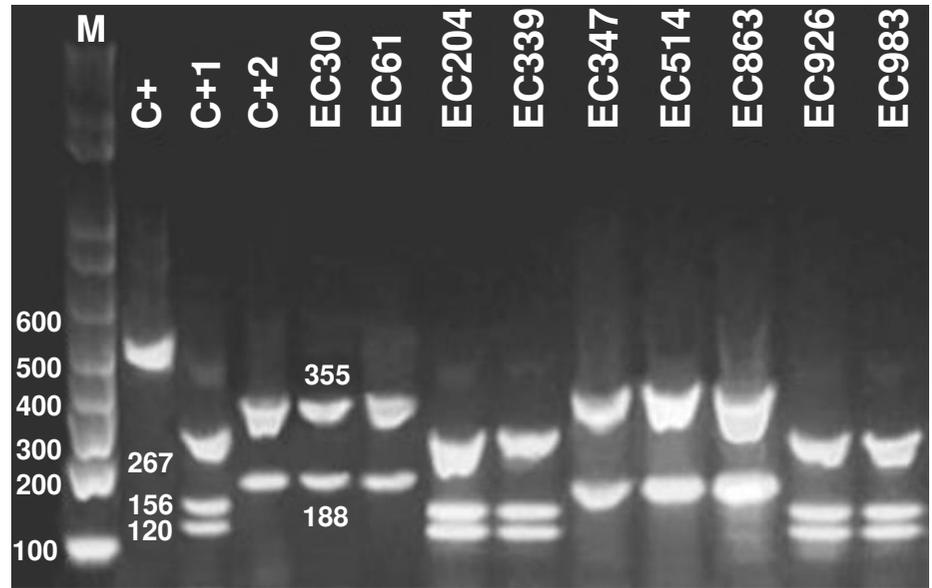


Figure 2. Digestion profile of the *bla*_{CTX-M} gene detected in *Escherichia coli* isolated from patients with community-acquired urinary infections

M: Molecular weight marker (1 kb Invitrogen); C+: Undigested *bla*_{CTX-M2} fragment; C+1: Control *bla*_{CTX-M1}, strain 2944NR; C+2: Control *bla*_{CTX-M2} Kp 22; lines 5-13: Isolates of *Escherichia coli* containing the *bla*_{CTX-M} gene

Table 2. Epidemiological and clinical variables associated with ESBL-producing *Escherichia coli*

Risk factors	n	ESBL + (n=21)	ESBL - (n=82)	P	RR (95% CI)
Male gender	20	9	11	0.962	
Age >60 years	20	9	11	0.002*	3.1 (1.5-6.4)
Complicated urinary tract infection	72	19	53	0.048	4.1 (1.1-16.5)
Recurrent urinary tract infection	38	5	33	0.183	
Previous (30 days) urinary catheterization	11	6	5	0.001*	3.3 (1.6-6.8)
Previous empiric treatment with first line beta-lactams ^{a,b}	35	13	28	0.134	
Treatment with extended spectrum cephalosporins ^{a,c}	28	5	23	0.313	
Renal lithiasis	32	7	25	0.603	
Renal impairment	12	2	10	0.493	
Diabetes	29	9	20	0.389	

ESBL: Extended spectrum β-lactamases; RR: Relative risk; CI: Confidence interval

* Statistically significant

^a Within three months

^b First line β-lactams: AMP, SAM, and CF

^c Extended spectrum cephalosporins: 3rd and 4th generation cephalosporins and monobactams (ATM)

Of the 20 male patients with complicated urinary tract infections, seven were aged over 60 with functional problems due to their prostate or kidneys and frequently attended the urology consultation for their control. All seven patients had urinary tract infections caused by ESBL-producing isolates. Of the 83 female patients with urinary tract infections, 53 were classified as complicated due to any of the abovementioned factors but with recurrent urinary tract infections within a year being the most frequent condition.

Discussion

The resistance of *E. coli* isolates from complicated urinary tract infections to many of the antimicrobials tested here indicates that treatment should only be given after susceptibility testing. High resistant rates to third-generation cephalosporins and aztreonam of clinical isolates of another bacteria, *K. pneumoniae*, have also been found in a previous study undertaken in Cumaná (12). The relatively high frequency of multidrug resistant *E. coli* found in the community and the high proportion of isolates showing resistance to ≥ 6 antimicrobials indicates the need to revise the treatment guidelines for urinary tract infections in Venezuela. A significant increase in the prevalence of multidrug resistant *E. coli* has also been reported in the US with rates raising from 9.1% in 2001 to 17.0% in 2010 (20) and resistance to three, four or five antimicrobial agents. In the same study, widespread resistance was observed for trimethoprim-sulfamethoxazole (62.6%, 88.6%, and 97.9%, respectively) and ciprofloxacin (48.9%, 84.3%, and 98.2%, respectively).

Uncomplicated community-acquired urinary tract infections are normally treated empirically without undertaking a urine culture or an antibiogram unless they recur repeatedly (21). Our findings, however, demonstrate the importance of monitoring this empirical use of antimicrobials at a community level as recommended by the Infectious Diseases Society of America in order to select an appropriate empirical treatment (22).

β -lactam antibiotics are commonly the first choice of treatment against many microorganisms including uropathogens. Nevertheless, in recent years there has been a progressive increase in the frequency of *E. coli* strains from outpatients that characteristically show reduced susceptibility to penicillins and third generation cephalosporins due to the production of ESBL (23). This is now considered an emergent problem at the community level especially as changes in epidemiological patterns have been observed: While SHV and TEM have been shown to be the most prevalent enzymes in nosocomial strains, CTX-M is reported as predominant in community-acquired strains (24).

In this study, phenotypic characterization revealed that an important fraction of the isolates studied produced ESBLs. Here, the bla_{TEM} gene was the most prevalent ESBL gene indicating the possible circulation of TEM-type ESBLs in strains from the community that have not been detected in nosocomial strains from the *Hospital General de Cumaná* (12). We also found variations in the antibiotic resistance of isolates containing only bla_{TEM} , which may suggest the presence of clavulanic-acid inhibited ESBLs not characterized in this study, or the presence of other bla_{TEM} type genes. The non-ESBL-producing isolates that did contain the bla_{TEM} gene are probably TEM-1 that confers resistance to penicillins and first-generation cephalosporins. Resistance to third-generation cephalosporins could then be due to other resistance mechanisms, for example, OXA-type enzymes which have been identified from some *E. coli* strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections in India (25). The bla_{SHV} gene has been found to be less frequent in community-based strains than bla_{TEM} and bla_{CTX-M} (26).

The identification of the specific CTX-M enzyme type from the susceptibility pattern proved to be difficult due to the overlapping of the ceftazidime and cefotaxime phenotypes and the fact that several genes were present. The wide dissemination of CTX-Ms around the world has been referred to as the "CTX-M pandemic" since this enzyme is the most common β -lactamase carried by the Enterobacteriaceae that cause community onset urinary tract infections as shown in reports from different continents (2,24,27-31).

In Venezuela, there have been very few reports that identify the type of *bla* genes found in bacterial strains causing urinary infections. The CTX-M-32 enzyme (CTX-M-1) was identified in an *E. coli* strain isolated from a patient with diabetes from the Mérida state who was also suffering from a community-acquired urinary tract infection, which is the first report of this variant in South America (32).

It is important to note that some CTX-M enzymes are associated with specific countries: CTX-M-9 in Spain; CTX-M-1 in Italy and the United Kingdom, and CTX-M-2 in Israel, Japan, and most South American countries (24,33). In contrast, variants such as CTX-M-15 (CTX-M-1), which originated from the Asp240Gly substitution in CTX-M-3 and CTX-M-14 have been detected all over the world (24,34). The seasonal appearance and spread of these enzymes in different habitats may partially explain their epidemiology. The use of antimicrobials and other risk factors in different regions, as well as the characteristics of different geographical compartments, may have contributed to the current situation surrounding CTX-M.

The *in vitro* bacterial conjugation assays demonstrated that the genes coding for ESBL are localized in transferable plasmids which also carry other resistance determinants affecting antimicrobials, such as aminoglycosides, trimethoprim-sulfamethoxazole, and quinolones. Furthermore, the transfer of resistance to ciprofloxacin and nalidixic acid indicates that these strains contain a resistance mechanism against this group of antimicrobials that can disseminate horizontally as well as vertically. In India, 94% of the CTX-M-producing isolates were able to transfer their genes by conjugation with plasmids ranging in size from 120 to 272 kbp and half of these plasmids also carried the TEM-1 gene (25). This dissemination of ESBL in conjugative plasmids increases the possibility of an accelerated rate of proliferation (2).

Few studies have evaluated risk factors for community-onset ESBL infections and some of the studies previously undertaken in the U.S.A. were conducted prior to the emergence of community-wide multidrug-resistant *E. coli* (35). Here we identified age over 60 years, complicated urinary tract infections, and urinary catheterization as risk factors for infection with ESBL-producing *E. coli* strains. Other studies have also shown older age (35-40), urinary catheterization (36,37,39) and complicated urinary tract infections (40) as factors that increase the risk of acquiring a urinary tract infection by multidrug resistant bacteria.

In conclusion, our results reveal the presence of multidrug resistant isolates that cause community-acquired urinary infections. This is of great epidemiological importance and requires the intervention of the health authorities in the region to prevent further dissemination of these types of strains.

Acknowledgements

We would like to thank the staff of the clinical bacteriology laboratory at the *Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá"*: Belkis Medina, Dianny Martínez, Lucy Rodríguez, José Antonio Barreto, Luisa Caña, Jose García, Diorelis González, Maylim Mundaray, and Verónica Peinado, for the support and effort they always give to research activities and the key role that they play in fighting against bacterial infections.

References

1. Laupland KB, Ross T, Pitout JD, Church DL, Gregson DB. Community-onset urinary tract infections: A population-based assessment. *Infection*. 2007;35:150. <https://doi.org/10.1007/s15010-007-6180-2>

2. Peirano G, Pitout JD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β -lactamases: The worldwide emergence of clone ST131 O25: H4. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35:316-21. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.003>
3. Guzmán-Blanco M, Labarca JA, Villegas MV, Gotuzzo E. Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *Braz J Infect Dis*. 2014;18:421-33. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.10.005>
4. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Front Microbiol*. 2012;3:110. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>
5. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:1-4. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004>
6. Dhillon RH, Clark J. ESBLs: A clear and present danger? *Crit Care Res Pract*. 2012;2012:625170. <https://doi.org/10.1155/2012/625170>
7. Narváez P, Pedroza R, Alonso G, Rodríguez-Lemoine V. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2005;25:29-34.
8. Guzmán M, Alonso G. Caracterización de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*. Sucre-Venezuela. *Invest Clin*. 2009;50:419-31.
9. Guevara A, Machado S, Manrique E. Urinary infections acquired in community: Epidemiology, resistance to antibiotics and therapeutic options. *Kasmera*. 2011;39:87-97.
10. Hernández E, Araque M, Millán Y, Millán B, Vielma S. Prevalencia de β -lactamasa CTX-M-15 en grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena aisladas en pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Invest Clin*. 2014;55:32-43.
11. de Cueto M. La microbiología en el diagnóstico de la infección del tracto urinario. In: Pigrau C, editor. *Infección del tracto urinario*. Primera edición. Madrid: Salvat; 2013. p. 11-22.
12. Nicolle LE, Bradley S, Colgan R, Rice JC, Schaeffer A, Hooton TM. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Infect Dis*. 2005;40:643-54. <https://doi.org/10.1086/427507>
13. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, *et al*. Health care-associated bloodstream infections in adults: A reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med*. 2002;137:791-7. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-137-10-200211190-00007>
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-four informational supplement, M100-S24. Wayne, PA: CLSI; 2014. p. 226.
15. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:268-81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
16. Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M, Hidri N, Verdet C, Ould-Hocine Z, *et al*. Dissemination of CTX-M- type beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:1249-55. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1249-1255.2004>
17. Haeggman S, Löfdal S, Poauw A, Verhoef J, Brisse S. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:2400-8. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2400-2408.2004>
18. Eldestein M, Pimkin M, Palagin I, Eldestein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:3724-32. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3724-3732.2003>
19. Mahboobeh N, Forghanifard M, Moshrefi S. Prevalence and molecular characterization of plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase genes (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX} and *bla*_{SHV}) among urinary *Escherichia coli* clinical isolates in Mashhad, Iran. *Iran J Basic Med Sci*. 2012;15:833-9.
20. Sánchez GV, Baird AM, Karlowsky JA, Master RN, Bordon JM. Nitrofurantoin retains antimicrobial activity against multidrug-resistant urinary *Escherichia coli* from US outpatients. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:3259-62. <https://doi.org/10.1093/jac/dku282>
21. Alos JI. Epidemiología y etiología de la infección urinaria comunitaria. Sensibilidad antimicrobiana de los principales patógenos y significado clínico de la resistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23:3-8. <https://doi.org/10.1157/13091442>

22. Spellberg B, Talbot G, Brass E, Bradley J, Boucher H, Gilbert D, *et al.* Position paper: Recommended design features of future clinical trials of antibacterial agents for community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2008;47(Suppl.3):S249-65. <https://doi.org/10.1086/591411>
23. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. *Clin Inf Dis.* 2001;32(Suppl.2):S94-103. <https://doi.org/10.1086/320182>
24. Canton R, Coque T. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9:466-75. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.011>
25. Hussain A, Ewers C, Nandanwar N, Guenther S, Jadhav S, Wieler LH, *et al.* Multiresistant uropathogenic *Escherichia coli* from a region in India where urinary tract infections are endemic: Genotypic and phenotypic characteristics of sequence type 131 isolates of the CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing lineage. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:6358. <https://doi.org/10.1128/AAC.01099-12>
26. Ben-Ami R, Rodríguez-Baño J, Arslan H, Pitout JD, Quentin C, Calbo ES, *et al.* A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in nonhospitalized patients. *Clin Infect Dis.* 2009;49:682-90. <https://doi.org/10.1086/604713>
27. Ahmed O, Alfadel O, Asghar H, Elhassan M. Prevalence of TEM, SHV and CTX-M genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. urinary isolates from Sudan with confirmed ESBL phenotype. *Life Sci J.* 2013;10:191-5.
28. Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:602-4. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.602-604.2002>
29. Wang H, Kelkar S, Wu W, Chen M, Quinn J. Clinical isolates of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum b-lactamases: Prevalence of CTX-M-3 at a hospital in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:790-3. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.790-793.2003>
30. Yamasaki K, Komatsu M, Yamashita T, Shimakawa K, Ura T, Nishio H, *et al.* Production of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase and IMP-1 metallo beta-lactamase by five Gram-negative bacilli: Survey of clinical isolates from seven laboratories collected in 1998 and 2000, in the Kinki region of Japan. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:631-8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg103>
31. Kung CH, Ku WW, Lee CH, Fung CP, Kuo SC, Chen TL, *et al.* Epidemiology and risk factors of community-onset urinary tract infection caused by extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a medical center in Taiwan: A prospective cohort study. *J Microbiol Immunol Infect.* 2015;48:168-74. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.08.006>
32. Araque M, Millán B, Mendoza E, Salas M. CTX-M-32 beta-lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated in Latin America. *J Infect Dev Ctries.* 2013;7:432-5. <https://doi.org/10.3855/jidc.3488>
33. Coque T, Baquero F, Cantón R. Increasing prevalence of ESBL-producing enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance.* 2008;47:19-29. <https://doi.org/10.2807/ese.13.47.19044-en>
34. Rossolini G, D'Andrea M, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:33-41. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x>
35. Banerjee R, Strahilevitz J, Johnson JR, Nagwekar PP, Schora DM, Shevrin I, *et al.* Predictors and molecular epidemiology of community-onset extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in a Midwestern community. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34:947-53. <https://doi.org/10.1086/671725>
36. Blanco VM, Maya JJ, Correa A, Perenguez M, Muñoz JS, Mota G, *et al.* Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34:559-65. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.11.017>
37. Kronenberg A, Hilty M, Endimiani A, Muhlemann K. Temporal trends of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in in- and outpatients in Switzerland, 2004 to 2011. *Euro Surveill.* 2013;18:20484. <https://doi.org/10.2807/ese.18.21.20484-en>

38. Anesi JA, Lautenbach E, Nachamkin I, Garrigan C, Bilker WB, Wheeler M, *et al*. Clinical and molecular characterization of community-onset urinary tract infections due to extended-spectrum cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2016;37:1433-9. <https://doi.org/10.1017/ice.2016.225>
39. Bours PH, Polak R, Hoepelman AI, Delgado E, Jarquin A, Matute AJ. Increasing resistance in community-acquired urinary tract infections in Latin America, five years after the implementation of national therapeutic guidelines. *Int J Infect Dis*. 2010;14:e770-4. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.02.2264>
40. Seija V, Fratchez V, Ventura V, Pintos M, González M. Factores asociados al desarrollo de infección urinaria de origen comunitario causada por *Escherichia coli* resistente a fluoroquinolonas. *Rev Chilena Infectol*. 2014;31:400-5. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000400004>

Artículo original

Caracterización clínica de la leptospirosis grave en un hospital de alta complejidad de Cali, Colombia, 2010-2016

Jorge Cedano¹, Sarita Rodríguez¹, Winy Kujundzic², Juan Sebastián Arana², Robinson Pacheco¹, Fernando Rosso^{1,2,3}

¹ Centro de Investigaciones Clínicas, Fundación Clínica Valle del Lili, Cali, Colombia

² Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Icesi, Cali, Colombia

³ Departamento de Medicina Interna-Infectología, Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia

Introducción. La leptospirosis es una infección bacteriana endémica en Colombia. Su curso clínico puede ser variable y, en ocasiones, fatal. Hay pocos estudios en el país sobre los casos graves de esta enfermedad.

Objetivo. Describir las características demográficas y clínicas de los pacientes con diagnóstico de leptospirosis grave hospitalizados en salas generales o atendidos en la unidad de cuidados intensivos de un hospital de cuarto nivel.

Materiales y métodos. Se llevó a cabo un estudio observacional descriptivo de los pacientes adultos y niños con diagnóstico serológico de leptospirosis entre el 2010 y el 2016.

Resultados. Se analizaron las historias clínicas de 87 pacientes, 74 % de los cuales correspondía a hombres y, el 84 %, a mayores de 18 años. El 35 % tenía alguna comorbilidad y la hipertensión arterial sistémica (16 %) y la diabetes mellitus (9 %) fueron las más comunes. Los síntomas más frecuentes fueron: fiebre, náuseas, astenia, mialgias, artralgias y dolor abdominal. El 34 % requirió atención en la unidad de cuidados intensivos, con una mediana de estancia de 5 días. El 61 % requirió hospitalización en sala general, con una mediana de estancia de 6 días. Todos los casos recibieron tratamiento antibiótico con ceftriaxona o doxiciclina. La tasa de letalidad fue del 1,1 % (n=1).

Conclusiones. La infección por *Leptospira* spp. tiene el riesgo de diagnosticarse de manera tardía por su presentación clínica inespecífica, lo que implica considerar un gran número de diagnósticos diferenciales. La atención temprana de los pacientes con cuadros graves de esta enfermedad en la unidad de cuidados intensivos, puede evitar una mayor incidencia de complicaciones y disminuir la mortalidad.

Palabras clave: *Leptospira*; leptospirosis/diagnóstico; espiroquetas; enfermedad de Weil; factores de riesgo.

Clinical characterization of patients with severe leptospirosis in a tertiary hospital in Cali, Colombia, 2010-2016

Introduction: Leptospirosis is an endemic bacterial infection in Colombia. Its clinical course can be variable and occasionally fatal. There are few studies in the country about severe cases of leptospirosis.

Objectives: To describe the demographic and clinical characteristics of patients with a diagnosis of leptospirosis, and their management in a high complexity hospital.

Materials and methods: This was a descriptive retrospective study of patients with a serologic diagnosis of leptospirosis between 2010 and 2016.

Results: We analyzed 87 patients, 74% of them were men, and 84% were older than 18 years; 35% had a comorbidity, the most common being arterial hypertension (16%) and diabetes mellitus (9%). The most frequent symptoms were fever, nausea, fatigue, myalgia, arthralgia, and abdominal pain. The majority of patients required hospitalization in general wards (61%), with a median stay of six days; 34% required management in the intensive care unit, with a median stay of five days. Mortality was 1.1% (n=1). All patients received treatment with either ceftriaxone or doxycycline.

Conclusions: There is a risk of leptospira infections having a late diagnosis given their unspecific clinical presentation, which generates a high number of differential diagnoses. The early management in the intensive care unit could decrease the incidence of complications and the mortality of patients with leptospirosis.

Keywords: *Leptospira*; leptospirosis/diagnosis; spirochaetales; Weil disease; risk factors.

Recibido: 19/07/17

Aceptado: 03/09/18

Publicado: 04/09/18

Citación:

Cedano J, Rodríguez S, Kujundzic W, Arana JS, Pacheco R, Rosso F. Caracterización clínica de la leptospirosis grave en un hospital de alta complejidad de Cali, Colombia, 2010-2016. Biomédica. 2019;39(Supl.1):108-16
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.3985>

Correspondencia:

Fernando Rosso, Avenida Simón Bolívar, Carrera 98 N° 18-49, Cali, Colombia
Teléfono: (316) 449 9673; fax: (572) 331 7499
fernando.rosso@fvl.org.co

Contribución de los autores:

Winy Kujundzic, Juan Sebastián Arana y Sarita Rodríguez: recolección de datos y creación de base de datos
Fernando Rosso, Jorge Cedano y Robinson Pacheco: análisis e interpretación de datos, revisión crítica del contenido
Todos los autores participaron en la redacción del manuscrito.

Financiación:

Este estudio fue financiado con fondos de la Fundación Valle del Lili.

Conflicto de intereses:

Los investigadores declaran no tener conflictos de intereses.

La leptospirosis es una zoonosis causada por especies patógenas de *Leptospira* (espiroquetas) del género *L. interrogans sensu lato*. Hasta ahora se han identificado, aproximadamente, 200 cepas, con una gran variabilidad antigénica (1).

La infección se adquiere por contacto con agua, alimentos o suelos contaminados con orina de animales infectados. Los reservorios más comunes son los roedores, las vacas, los cerdos, los perros, los caballos, las ovejas y las cabras (2,3), que, usualmente, son portadores asintomáticos y cuyos túbulos renales son colonizados por la bacteria, la cual es excretada en la orina durante el resto de sus vidas (4).

La infección en los humanos se adquiere por contacto con fuentes contaminadas cuando hay abrasiones en la piel, las membranas mucosas o las conjuntivas, y raramente, por la ingestión de alimentos contaminados (2). Ciertos grupos de poblaciones tienen mayor riesgo de exposición debido a su trabajo en actividades agrícolas o en la manipulación de animales o de sus derivados (trabajadores de mataderos, militares, médicos veterinarios y auxiliares de clínicas veterinarias, ordeñadores en granjas de ganado, agricultores y operarios en instalaciones porcícolas o piscícolas) (2,5).

La enfermedad es de distribución mundial, con mayor incidencia en los países tropicales debido a las condiciones climáticas que favorecen su transmisión. Es endémica en el Caribe, Latinoamérica, el subcontinente indio, Asia suroccidental, Oceanía y en zonas occidentales de Europa (2,6).

La incidencia anual estimada es de 0,1 y 10 casos por 100.000 habitantes en climas templados y tropicales, respectivamente. En las zonas de brotes, como Brasil, el sudeste asiático y China, se reporta una incidencia de 100 por cada 100.000 habitantes (7). Se estima que se presentan 1'030.000 casos y 58.900 muertes al año a nivel mundial (8).

En Colombia, la prevalencia de esta zoonosis reemergente oscila entre el 6 y el 35 % en humanos. Los departamentos del Valle del Cauca, Antioquia, Risaralda y Atlántico tienen el nivel más alto de notificación (7), la cual es obligatoria desde el 2007. La prevalencia en animales es del 41 al 61 % en ganado bovino, del 10 % en cerdos, del 47 % en perros, del 23 % en primates no humanos, y del 25 al 83 % en roedores. Además, se asocia con actividades acuáticas en agua dulce y con condiciones de pobreza (2,9).

Las infecciones por *Leptospira* spp. pueden ser asintomáticas o presentarse con signos y síntomas inespecíficos, como cefalea, mialgias, náuseas, vómitos, diarrea, erupción cutánea, dolor abdominal, eritema conjuntival y esplenomegalia. En casos graves, puede presentarse compromiso orgánico, choque séptico, dificultad respiratoria, miocarditis, rabiomíolisis, vasculitis, hemorragia, disfunción hepática o renal y muerte. Aproximadamente, el 10 % de las infecciones sintomáticas se presenta como enfermedad de Weil, la cual afecta los riñones y el hígado (2-4). Por su presentación inespecífica, el diagnóstico se basa en la sospecha clínica y la presencia de factores de riesgo, y puede confirmarse con la serología. Se trata con antibióticos como doxicilina, penicilina G o ceftriaxona, dependiendo de la gravedad de la infección (6,9).

En la actualidad, el diagnóstico de leptospirosis es un reto, ya que se requiere un alto grado de sospecha para detectarla, debido a que la presentación clínica es inespecífica y similar a la de otras enfermedades infecciosas. Por otro lado, las pruebas diagnósticas que se utilizan son de bajo rendimiento. La

sensibilidad del cultivo y de la prueba de aglutinación microscópica (*Microscopic Agglutination Test*, MAT) solo alcanzan el 10 % y el 49 %, respectivamente; si se practican las dos, la sensibilidad se incrementa apenas al 55 % (10).

En los últimos años, se ha fortalecido la vigilancia de la leptospirosis en Colombia y se ha establecido la notificación rutinaria por parte de las entidades territoriales. Sin embargo, en la literatura médica nacional hay pocos reportes sobre el curso clínico de esta enfermedad.

El propósito de este estudio fue describir el curso clínico y su resultado en pacientes con leptospirosis grave en un hospital de alta complejidad de Cali.

Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio observacional descriptivo de una serie de pacientes tratados en un centro de cuarto nivel de complejidad de Cali entre enero del 2010 y junio del 2016.

Se incluyeron pacientes de ambos sexos, de todas las edades, con sospecha clínica de leptospirosis y prueba positiva de inmunoglobulina M (IgM ELISA-PanBio®, BioMérieux) para leptospira, aunque sin confirmación con otras pruebas, como la MAT. Se solicitaron las historias clínicas y las fichas epidemiológicas al comité de vigilancia epidemiológica. Se registraron los datos sociodemográficos, las comorbilidades, las manifestaciones clínicas, los exámenes de laboratorio, el tratamiento y el resultado en cada caso.

Toda la información clínica, de laboratorio y epidemiológica, se recolectó en una base electrónica de datos. Se clasificaron las comorbilidades existentes antes del desarrollo de la infección, como hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica, cirrosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica e insuficiencia cardíaca congestiva, entre otras, a partir de los diagnósticos registrados en la historia clínica.

Se hizo el análisis univariado para evaluar la distribución de las variables numéricas mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Los datos se resumieron usando medidas de tendencia central (promedios y desviación estándar) o mediana y rangos intercuartílicos, según correspondiera. Las variables cualitativas se expresaron como proporciones. Los análisis se hicieron con el paquete estadístico Stata™ (Stata Corp, 2011, College Station, TX, USA).

El estudio tuvo limitaciones al tratarse de un estudio retrospectivo, en el cual los casos no fueron confirmados mediante MAT ni se determinaron los serovares.

Consideraciones éticas

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de Investigaciones en Humanos de la Fundación Clínica Valle del Lili, según Acta No. 9 del 20 de abril de 2015.

Resultados

Entre enero de 2010 y junio de 2016, se analizaron las historias clínicas de 87 pacientes. La mediana de edad fue de 36 años (rango: 20-50); el 16 % era menor de 18 años, con una mediana de edad de 13,5 (rango: 10-15), y los mayores de 18 años tenían una mediana de 38 años (rango: 26-57). El 73 % de los pacientes eran hombres, con una mediana de edad de 34 años (rango: 20-40), en tanto que las mujeres tenían una mediana de 38 años (rango: 24-61). El 9 % de los pacientes era mayor de 65 años.

El 81 % reportó contacto con animales, el 26 % tuvo contacto con perros, el 20 % lo tuvo con gatos, el 16 % con roedores y, un porcentaje menor tuvo contacto con ganado bovino (3,5 %), equino (2,3 %) o porcino, y solo el 6 % reportó que consideraba que estos animales estaban enfermos.

La fuente principal de agua en la mayoría de los casos era el acueducto (40,2 %) y solo el 2 % reportó inundación reciente.

El 35 % de los pacientes sufría enfermedad crónica, y las más comunes fueron la hipertensión arterial sistémica (16 %) y la diabetes (9 %), en tanto que, en menor proporción, se reportó hipotiroidismo (6 %), falla renal crónica (4 %), cáncer (2%) y cardiopatía (2 %) (cuadro 1).

Los síntomas más frecuentes fueron: fiebre (85 %), náuseas (67 %), astenia (49 %), mialgias (57 %), artralgias (64 %), dolor abdominal (52 %)

Cuadro 1. Casos de leptospirosis según características sociodemográficas, Fundación Valle del Lili, Cali, 2010-2016

Variable	n (%)
Sexo masculino	64 (73,56)
0-17 años	14 (16,1)
18-65 años	65 (74,7)
Desempleado	15 (17,2)
Agricultor	9 (10,3)
Militar	8 (9,2)
Contacto con animales	71 (81,6)
Contacto con ratas	14 (16,1)
Agua de acueducto	35 (40,2)
Embarazo	5 (5,8)
Comorbilidades	31 (35,6)
Hipertensión arterial sistémica	14 (16,1)
Diabetes mellitus	8 (9,2)

y diarrea (35 %). Las manifestaciones pulmonares fueron más comunes en adultos (20 %). En menores de 18 años, los síntomas más frecuentes fueron: fiebre (92 %), náuseas y dolor abdominal, con 71 % cada uno. Las complicaciones hemorrágicas, como sangrado gastrointestinal (hematemesis o melenas) y epistaxis, fueron más comunes en los niños (28 %), en tanto que solo el 13 % de los adultos las presentaron; se reportó hematuria en 5 pacientes y sangrado gastrointestinal en 4. La diarrea fue una manifestación más común en niños (64 Vs. 30 %), y esta diferencia fue estadísticamente significativa (cuadro 2).

Las alteraciones más comunes detectadas en los exámenes de laboratorio, fueron: neutrofilia (55 %), anemia (52 %), leucocitosis (45 %), trombocitopenia (45 %), y elevación de la lactato deshidrogenasa (LDH) (39 %), de la bilirrubina total (42 %), de la alanina transaminasa (ALT) (38 %) y de la aspartato aminotransferasa (AST) (39 %). El valor promedio de la ALT fue de 85 UI/L (desviación estándar, DE=38,4-159), de la AST, 85,7 UI/L (DE=33-166), de la LDH, 350UI/L (DE=245-636), de la bilirrubina total, 1,2 mg/dl (DE=0,5-8,56) y de la bilirrubina directa, 0,56 mg/dl (DE=0,16-7). Además, 14 pacientes presentaron elevación de la ALT o la AST mayor

Cuadro 2. Casos de leptospirosis según características clínicas, Fundación Valle del Lili Cali, 2010-2016

Signos clínicos	Total (N=87) n (%)	<18 años (n=14) n (%)	>18 años (n=73) n (%)	p
Fiebre	74 (85,1)	13 (92,9)	61 (83,6)	0,372
Náuseas	59 (67,8)	10 (71,4)	49 (67,1)	1
Vómito	27 (31)	6 (42,9)	21 (28,8)	0,297
Cefalea	35 (40,2)	6 (42,9)	29 (39,7)	0,827
Escalofríos	17 (19,5)	2 (14,3)	15 (20,5)	0,728
Exantema	8 (9,2)	1 (7,1)	7 (9,6)	1
Astenia	43 (49,4)	7 (50)	36 (49,3)	0,963
Mialgias	50 (57,5)	4 (28,6)	46 (63)	0,017
Artralgias	56 (64,4)	7 (50)	49 (67,1)	0,238
Dolor abdominal	46 (52,9)	10 (71,4)	36 (49,3)	0,129
Diarrea	31 (35,6)	9 (64,3)	22 (30,1)	0,03
Linfadenopatías	7 (8)	2 (14,3)	5 (6,8)	0,313
Ictericia	24 (27,6)	1 (7,1)	23 (31,5)	0,1
Hepatomegalia	11 (12,6)	2 (14,3)	9 (12,3)	1
Esplenomegalia	3 (3,4)	0	3 (4,1)	1
Manifestaciones pulmonares	16 (18,4)	1 (7,1)	15 (20,5)	0,089
Hemorragia	14 (16,1)	4 (28,6)	10 (13,7)	0,228

de 400 UI/L y 7 presentaron elevación de la LDH a más de 1.000 UI/L; en el análisis de orina de 16 de los pacientes se informaron alteraciones, especialmente hematuria (15 %) y proteinuria (11 %) (cuadro 3).

El 34 % de los pacientes tuvo que ser atendido en la unidad de cuidados intensivos y, de este porcentaje, el 42 % tenía alguna comorbilidad. La mediana de estancia hospitalaria fue de 6 días en las salas de hospitalización general (rango intercuartílico, RI=4-9,5) y, de 5 días, en la unidad de cuidados intensivos (RI=3-13), y 13 pacientes recibieron transfusión de hemoderivados. Solo hubo un caso fatal.

Los antibióticos más usados para el tratamiento de la leptospirosis fueron la ceftriaxona y la doxiciclina. Se presentaron lesiones orgánicas en 23 pacientes, y el 2 % tuvo infecciones asociadas con la atención en salud. El 17 % presentó enfermedad de Weil (ictericia, lesión renal con oliguria, síndrome de reacción inflamatoria sistémica y manifestaciones hemorrágicas), que requirió asistencia respiratoria mecánica en la unidad de cuidados intensivos (cuadro 4). Entre los pacientes que requirieron atención en esta unidad, la causa más frecuente de ingreso fue la falla renal aguda (n=15), seguida del choque séptico (n=2), la encefalopatía hepática (n=2) y la miocarditis (n=1).

Discusión

Se describen 87 pacientes con diagnóstico de leptospirosis atendidos en un centro de cuarto nivel de complejidad de Cali, Colombia. La mayoría de los pacientes eran hombres, hallazgo comparable con el de otros estudios nacionales (11), lo cual podría explicarse por la asociación entre el sexo y el tipo de actividades relacionadas con esta enfermedad (12,13). Además, el grupo de edad más frecuente fue el de los adultos en edad productiva.

La presentación clínica de la leptospirosis tiene un amplio espectro. Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron: fiebre, náuseas, mialgia, dolor abdominal, artralgias, astenia y cefalea, cuadro clínico similar al reportado en otras series en las que la fiebre, las mialgias y el dolor abdominal habían sido los síntomas más comunes (11,14). Otras manifestaciones, como la esplenomegalia, variaron significativamente entre los estudios (3-94 %) (14).

Cuadro 3. Exámenes de laboratorio de pacientes con diagnóstico de leptospirosis

Exámenes de laboratorio	Total (%)	Exámenes de laboratorio	Total (%)
Leucocitosis (>11.000 células/mm ³)	39 (44,8)	Leucocituria	8 (0,2)
Leucocitos (células/mm ³)	10.455 (7.950-15.150)	Hematuria	13 (14,9)
Neutrofilia (>6.000 células/mm ³)	48 (55,2)	ALT valor	85 (8,4-159)
Neutrófilos (células/mm ³)	7.150 (3.600-11.670)	ALT>120 UI/L	33 (37,9)
Hemoglobina (g/dl)	10,7 ± 2,9	ALT>400 UI/L	5 (5,7)
Anemia (<12 g/dl)	45 (51,7)	AST	85,7 (33-166)
Trombocitopenia (<150.000/mm ³)	39 (44,8)	AST>120 UI/L	34 (39,1)
Plaquetas (células/mm ³)	163.000 (111.000-237.000)	AST>400 UI/L	9 (10,3)
Hematocrito elevado (>45 %)	5 (5,7)	LDH	350 (DE=245-636)
Hematocrito (%)	39 (3-41)	LDH>200 UI/L	40 (46)
Hipernatremia (>145 mEq/L)	9 (10,3)	LDH>1.000 UI/L	7 (8)
Hiponatremia (<135 mEq/L)	17 (19,5)	Bilirrubina total (UI/L)	1,2 (0,5-8,56)
Hiperpotasemia (>5,5 mEq/L)	2 (2,3)	Bilirrubina total elevada (>1,0 UI/L)	37 (42,5)
Hipopotasemia (<3,5 mEq/L)	8 (9,2)	Bilirrubina directa (UI/L)	0,56 (0,16-7)
Alteraciones en análisis de orina	16 (18,4)	Bilirrubina directa elevada (>0,3 UI/L)	41 (47,1)
Proteinuria	10 (11,5)		

ALT: alanino transaminasa; AST: aspartato aminotransferasa; LDH: lactato deshidrogenasa

Cuadro 4. Tratamiento y resultados en pacientes con diagnóstico de leptospirosis, Fundación Valle del Lili, Cali, 2010-2016

Variables	Total (N=87) n (%)	<18 años (n=14) n (%)	>18 años (n=73) n (%)
Urgencias	73 (83,9)	12 (85,7)	61 (83,6)
Ambulatorio	1 (1,1)	0	1 (1,4)
Hospitalización	47 (54)	9 (64,3)	38 (52,1)
Urgencias	9 (10,3)	1 (7,1)	8 (11)
Unidad de cuidados intensivos	29 (33,3)	4 (28,6)	25 (34,2)
Presencia de choque	8 (9,2)	1 (7,1)	7 (9,6)
Días de hospitalización	6 (4-9,5)	7 (3-9)	6 (4-10)
Días en la unidad de cuidados intensivos	5 (3-13)	6 (2,5-12)	5 (3-13)
Transfusiones			
Glóbulos rojos	12 (13,8)	3 (21,43)	9 (12,33)
Plaquetas	3 (3,4)	0 (0)	3 (4,11)
Plasma	2 (2,3)	0 (0)	2 (2,74)
Uso de antibióticos	76 (87,4)	12 (85,71)	64 (87,67)
Días de uso	9 (6-10)	9 (8,5-10,5)	7 (5-10)
Uso de vasopresores	4 (4,6)	1 (7,14)	3 (4,11)
Muerte	1 (1,1)	0	1 (1,4)

Es importante resaltar que la frecuencia de ictericia fue menor que la reportada en otros estudios (45,5 a 62 %). Este signo puede encontrarse en un gran porcentaje de los pacientes que fallecen, como una de las manifestaciones del síndrome de Weil, forma de presentación grave de la enfermedad (11). Esta menor proporción de ictericia pudiera sugerir que los casos fueron detectados más tempranamente.

En el presente estudio, no se utilizó la prueba de referencia (MAT) para el diagnóstico de la leptospirosis ya que en Colombia, habitualmente, se utiliza con propósitos de vigilancia y su disponibilidad es limitada, por lo que solo se emplea en centros especializados. Por ello, el diagnóstico se basó en la sospecha clínica y la detección de los anticuerpos (IgM) de leptospira.

En cuanto a los resultados de los exámenes adicionales de laboratorio, la mayoría de los pacientes presentaron neutrofilia y, cerca de la mitad, trombocitopenia, lo cual se ha descrito en casos de leptospirosis grave en los que hasta el 50 % puede presentar trombocitopenia (15,16).

Los diagnósticos diferenciales de cuadros con manifestaciones similares a la leptospirosis, son múltiples y se asocian principalmente con infecciones como el dengue y el chikungunya. En este estudio, se documentó un solo caso de infección concomitante con dengue, el cual no requirió atención en la unidad de cuidados intensivos, se trató con antibióticos y tuvo un curso clínico benigno. En presencia de estas infecciones virales concomitantes, el tratamiento antibiótico oportuno puede reducir significativamente la mortalidad (17,18).

La mortalidad entre los pacientes atendidos en nuestra institución, está por debajo de lo reportado en el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública de Colombia. La mortalidad descrita varía entre 1,5 y 5 %, e incluso, es mayor en casos graves, hasta alcanzar el 10 % (15). En informes recientes de la literatura médica sobre casos atendidos en Colombia, se reportó una mortalidad del 5 % (11), mayor que la registrada en este estudio (5 Vs. 1 %); el porcentaje de pacientes con síndrome de Weil también fue menor en la presente serie de casos (17 Vs. 38 %), así como la duración de la hospitalización en cuidados intensivos (34 Vs. 16 %). Estas diferencias en la mortalidad podrían estar asociadas con el reconocimiento tardío de la enfermedad, la falta de un tratamiento médico agresivo o la dificultad de acceso a las unidades de cuidados intensivos. En diversos estudios publicados, se ha concluido que es preferible atender los casos graves en este tipo de unidades (11,19,20).

Es difícil determinar tempranamente la necesidad de atención en la unidad de cuidados intensivos de estos pacientes. Complicaciones como la falla renal aguda que requiere diálisis, la diátesis hemorrágica y la ictericia grave, son las más comúnmente reportadas como asociadas con la leptospirosis grave, lo que denota un diagnóstico tardío de la enfermedad (19) y de las complicaciones, y ello, a su vez, estaría asociado con una mayor mortalidad. El retraso en el reconocimiento y en el tratamiento de estos pacientes puede tener resultados graves, como insuficiencia renal, insuficiencia hepática e, incluso, la muerte (20).

La presentación inespecífica de la leptospirosis dificulta el diagnóstico temprano, especialmente, por su sintomatología similar a la de otros síndromes febriles en áreas endémicas. Por lo tanto, se debe hacer énfasis en el diagnóstico más temprano de la infección y de sus complicaciones.

En conclusión, la presente serie incluyó casos complejos de la enfermedad, aunque el diagnóstico y el reconocimiento temprano de la enfermedad y de sus complicaciones, así como un mayor acceso a los cuidados intensivos, se asociaron con una menor mortalidad. Estos hallazgos sugieren que la mortalidad por leptospirosis es prevenible.

Referencias

1. Chin J. Manual de Control de Enfermedades Transmisibles. 16ª edición. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 1997. p. 564-5.
2. Day N. Epidemiology, microbiology, clinical manifestations and diagnosis of leptospirosis, 2017. Fecha de consulta: 2 de mayo de 2017. Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-microbiology-clinical-manifestations-and-diagnosis-of-leptospirosis>
3. Dupouey J, Faucher B, Edouard S, Richet H, Broucker A, Marie L, *et al.* Epidemiological investigation of a human leptospirosis case reported in a suburban area near Marseille. *New Microbes New Infect.* 2014;2:82-3 <https://doi.org/10.1002/nmi2.45>
4. Murray PR. Microbiología médica. Sexta edición. Madrid: Elsevier; 2009. p. 416-9.
5. Góngora A, Parra J, Aponte L, Gómez L. Seroprevalencia de *Leptospira* spp. en grupos de población de Villavicencio, Colombia. *Rev Salud Pública (Bogotá).* 2008;10:269-78. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642008000200007>
6. de Vries SG, Visser BJ, Nagel IM, Goris MG, Hartskeerl R, Grobusch MP. Leptospirosis in Sub-Saharan Africa: A systematic review. *Int J Infect Dis.* 2014;28:47-64. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.06.013>
7. Bello S, Rodríguez M, Paredes A, Mendivelso F, Walteros D, Rodríguez F, *et al.* Comportamiento de la vigilancia epidemiológica de la leptospirosis humana en Colombia 2007-2011. *Biomédica.* 2013;33(Supl.1):1608. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.1608>
8. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgeson P, Martínez MS, *et al.* Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;17:9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>
9. Carreño LA. Prevalencia de leptospirosis en Colombia. Revisión sistemática de la literatura (tesis). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2014.
10. Limmathurotsakul D, Turner EL, Wuthiekanun V, Thaipadungpanit J, Suputtamongkol Y, Chierakul W, *et al.* Fool's gold: Why imperfect reference test are undermining the evaluation of novel diagnostics: A reevaluation of a 5 diagnostic tests for leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 2012;55:322-31. <https://doi.org/10.1093/cid/cis403>
11. Echeverri-Toro LM, Penagos S, Castañeda L, Villa P, Atehortúa S, Ramírez F, *et al.* Características sociodemográficas y clínicas de pacientes con infección por *Leptospira* spp. atendidos en cuatro centros hospitalarios de Medellín, Colombia 2008-2013. *Biomédica.* 2017;37:62-7. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3280>
12. Ferro BE, Rodríguez AL, Pérez M, Travi BL. Seroprevalencia de infección por *Leptospira* en habitantes de barrios periféricos de Cali. *Biomédica.* 2006;26:250-7. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i2.1414>
13. García R, Reyes A, Basilio D, Ramírez M, Rivas B. Leptospirosis: un problema de salud pública. *Rev Latinoamer Patol Clin.* 2013;60:57-70.
14. Pérez-García J, Arboleda M, Agudelo-Flórez P. Leptospirosis infantil en pacientes con síndrome febril en la región de Urabá, Colombia. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2016;33:745-50. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.334.2561>
15. Cruz CM, Arboleda M. Perfil hematológico, renal y hepático en pacientes con leptospirosis. Primera edición. Medellín: CES; 2011.
16. Rojas G, Kong J, Donoso A, Prado P. Una causa infrecuente de falla renal aguda e ictericia. Leptospirosis: caso clínico y revisión de la literatura. *Rev Chil Pediatr.* 2001;72:230-4. <https://doi.org/10.4067/S0370-41062001000300008>
17. Wijesinghe A, Gnanapragash N, Ranasinghe G, Ragnathan MK. Fatal co-infection with leptospirosis and dengue in a Sri Lankan male. *BMC Res Notes.* 2015;8:348. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1321-7>

18. Nhan TX, Bonnieux E, Rovey C, De Pina JJ, Musso D. Fatal leptospirosis and chikungunya co-infection: Do not forget leptospirosis during chikungunya outbreaks. *IDCases*. 2016;5:12-4. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2016.06.003>
19. Vieira S, Brauner J, Fonseca D. Leptospirosis in the intensive care unit: A cohort of 57 patients. *Crit Care*. 2005;9(Suppl.1):31. <https://doi.org/10.1186/cc3094>
20. Michalopoulos A, Pappas G, Papadakis E, Christoforatos T, Malamos P, Koumoudiou C, *et al.* Leptospirosis in a European intensive care unit. *Scand J Infect Dis*. 2010;42:69-71. <https://doi.org/10.3109/00365540903302861>

Artículo original

La importancia de investigar *Mycobacterium bovis* en muestras clínicas de procedencia humana

Julio César Martínez¹, Claudia Llerena², Yanelly Angélica Valbuena²

¹ Centro de Investigación y Atención en Salud del Magdalena Medio, CISMAG, Barrancabermeja, Colombia

² Grupo de Micobacterias, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa que continúa siendo un problema mundial de salud pública. Es la principal causa de mortalidad en personas con HIV.

Objetivo. Identificar la presencia de *Mycobacterium bovis* como agente etiológico de tuberculosis humana en muestras de esputo con baciloscopia positiva, mediante la prueba Genotype MTBC™.

Materiales y métodos. Se llevó a cabo un estudio descriptivo de 88 muestras de esputo remitidas al Grupo de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud entre enero y noviembre de 2015. Se hizo el análisis microbiológico convencional y se empleó la prueba molecular de Genotype MTBC™ para diferenciar las especies del complejo *M. tuberculosis*.

Resultados. Sesenta y dos casos (70,5 %) correspondían a pacientes de sexo masculino; los grupos más afectados fueron el de 24 a 34 años, el de residentes en las cabeceras municipales, y el de afiliados al régimen subsidiado. En el 50 % (44) de las muestras con resultados en la prueba de identificación de la especie, se detectó el complejo *M. tuberculosis*.

Conclusiones. La mayor carga de la enfermedad se registró en la población masculina y en edad productiva. La prueba de identificación para especies del complejo, solo demostró la presencia de *M. tuberculosis*. Sin embargo, con estos datos no es posible descartar *M. bovis* en humanos con tuberculosis en Colombia. La identificación diferencial de la especie debería implementarse de forma rutinaria en los casos de tuberculosis en los grupos de riesgo y en las zonas donde se conoce la circulación de esta micobacteria en bovinos.

Palabras clave: *Mycobacterium bovis*; *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis; zoonosis; salud pública; Colombia.

Importance of investigating *Mycobacterium bovis* in clinical samples of human origin

Introduction: Tuberculosis is an infectious disease that still represents a major public health problem worldwide. It is one of the main causes of mortality in people with HIV.

Objective: To identify the presence of *M. bovis* as an etiological agent of human tuberculosis in sputum smear positive samples using the test Genotype MTBC™.

Materials and methods: We conducted a descriptive study, 88 sputum samples were submitted to the *Grupo de Micobacterias* of the *Instituto Nacional de Salud* between January and November, 2015. We used the conventional microbiological analysis and the molecular test Genotype MTBC™ to identify the *M. tuberculosis* complex species.

Results: Sixty two (70.5%) were males; the most affected groups were those between 24 and 34 years old, those residing in the municipal seats and those affiliated to the subsidized health plans. In 50.0% (44) of the samples with a result in the species identification test, we detected *M. tuberculosis*.

Conclusion: The highest burden of the disease was recorded among the male population in productive ages. The identification test for species of the complex showed all were *M. tuberculosis*. However, it is not possible to discard the presence of *M. bovis* in humans in Colombia. The differential identification of species should be done in risk groups and in areas where the circulation of this mycobacterium in cattle is known.

Keywords: *Mycobacterium bovis*; *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis; zoonosis; public health; Colombia.

La tuberculosis humana es una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial, causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* (1). Aunque este es el agente etiológico más frecuente, también puede ser causada por *M. bovis*, principal agente etiológico de la tuberculosis bovina (2).

Recibido: 15/02/18

Aceptado: 04/09/18

Publicado: 05/09/18

Citación:

Martínez JC, Llerena C, Valbuena YA. La importancia de investigar *Mycobacterium bovis* en muestras clínicas de procedencia humana. Biomédica. 2019;39(Supl.1):117-24

<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.4358>

Correspondencia:

Julio César Martínez, Carrera 24S N° 43-63, Barrancabermeja, Colombia
Teléfono: (577) 612 4956
jucer1023@hotmail.com

Contribución de los autores:

Julio Cesar Martínez y Claudia Llerena: consolidación y análisis de la información
Yanelly Angélica Valbuena: análisis microbiológico y molecular de las muestras
Todos los autores participaron en la escritura del artículo.

Financiación:

Instituto Nacional de Salud de Colombia

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses en relación con la preparación y la publicación de este trabajo.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que 10,4 millones de personas enfermarían de tuberculosis en el mundo en el 2015. En ese mismo año, se notificaron 6,1 millones de casos, alrededor de 4,3 millones no se diagnosticaron y 1,4 millones de muertes se atribuyeron a la enfermedad (3). Estas cifras ubican la tuberculosis como una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad de origen infeccioso a nivel mundial, y la situación es más alarmante en los países de bajos y medianos ingresos, en los cuales ocurren de 95 a 98% de los casos, principalmente en las personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (4).

La situación en Colombia no está lejos de esta problemática mundial, pues en el 2017 se notificaron 14.187 casos de tuberculosis incluidas todas sus formas, con una incidencia de 26 casos por 100.000 habitantes. Además, se registraron 1.083 muertes debidas a la enfermedad, con una tasa de mortalidad de 2,25 muertes por 100.000 habitantes (5).

En la actualidad no se conoce la magnitud real de la morbilidad atribuida a *M. bovis*; sin embargo, se estima que el 3 % de los casos de tuberculosis ocurridos en el mundo se deben a esta micobacteria. La transmisión zoonótica ocurre principalmente por el consumo de productos lácteos o de sus derivados sin pasteurizar, y por el contacto con animales y humanos infectados (6-8).

En la región de las Américas, la tuberculosis por *M. bovis* en humanos se ha documentado en varios países. Argentina tiene una prevalencia estimada entre 0,4 y 6,0 %, superada por algunas zonas endémicas de México, con cifras de hasta 13,8 %. En otras áreas, como en la frontera sur de los Estados Unidos, también se ha documentado que cerca del 70 % de los casos de tuberculosis son causados por *M. bovis*, con la mayor proporción en personas de origen mexicano (9-12). Entre 1996 y 2006, se registraron tres casos en Brasil y, entre 1998 y 2005, dos casos en Ecuador y tres en Uruguay, lo que indica que en los países de la región la prevalencia es baja, aunque debe anotarse que hay subregistro de casos (13,14).

Los signos y síntomas clínicos de la tuberculosis producida por *M. bovis* no se diferencian de los de la enfermedad causada por *M. tuberculosis*, lo que dificulta su diagnóstico y exige que su diferenciación se haga mediante técnicas moleculares (15,16). Esta diferenciación de especies es importante para establecer el esquema de tratamiento, debido a que las cepas de *M. bovis* tienen resistencia natural a la pirazinamida (17,18).

Varias instituciones de la red de laboratorios de tuberculosis de Colombia, utilizan las pruebas moleculares en las muestras directas. En el caso de los laboratorios de salud pública, se recurre a estos métodos a partir de los cultivos positivos. Son pocos los casos de *M. bovis* identificados en humanos, debido a que la diferenciación de especies del complejo *M. tuberculosis* no se hace de forma rutinaria y los métodos disponibles no tienen este alcance.

El objetivo de este trabajo fue identificar las especies del complejo *M. tuberculosis* en muestras de esputo con baciloscopia positiva, recibidas en el Grupo de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud entre enero y noviembre de 2015.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio descriptivo, en el cual se incluyeron 88 muestras de esputo con baciloscopia positiva provenientes de personas con antecedentes de tratamiento contra la tuberculosis en el marco de las acciones de

vigilancia, entre enero y noviembre de 2015. Dichas muestras se priorizaron para la prueba molecular de identificación de la especie. Las muestras habían sido remitidas por algunos de los laboratorios de salud pública del país que no cuentan con estas metodologías.

Se hizo la baciloscopia de las muestras empleando la coloración de Ziehl-Neelsen; se descontaminaron con el método de NaOH-N-acetil-L-cisteína, y el ADN se extrajo con el estuche GenoLyse DNA Extraction™ (19,20). La prueba molecular empleada fue la Genotype MTBC™, la cual permite diferenciar las especies del complejo *M. tuberculosis*, siguiendo las instrucciones del fabricante (21).

Los casos se graficaron en un mapa con la herramienta ArcGIS™ en su versión de prueba, para establecer la distribución geográfica según el origen de los pacientes.

Con la información registrada en el formato único de vigilancia de las micobacterias, se analizaron las siguientes características sociodemográficas: entidad territorial de procedencia de la muestra en términos de frecuencias absolutas y relativas; sexo; lugar de residencia; afiliación al Sistema General de Seguridad Social en Salud; pertenencia étnica; edad y resultado de la prueba de identificación de la especie. Esta información se incluyó en una base de datos de Excel™ para su análisis.

Consideraciones éticas

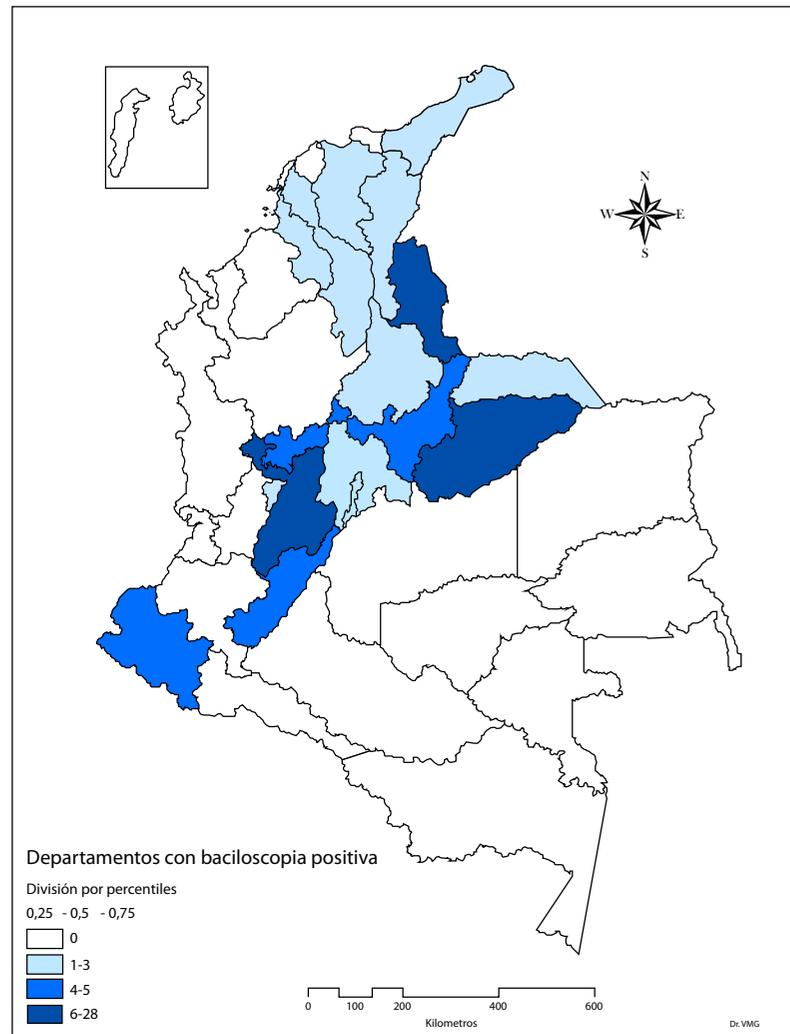
El estudio se rigió por los principios metodológicos requeridos para salvaguardar el interés de la ciencia y el respeto a los derechos de las personas. En los procedimientos no hubo ninguna intervención en humanos y no se violó el derecho a la privacidad, ya que los resultados se presentaron de manera anónima.

Resultados

Cuarenta y siete de las 88 (53,4 %) muestras analizadas procedía de los departamentos en los que se ha comprobado la circulación de *M. bovis* en bovinos (22): Norte de Santander, 28 (31,8 %); Casanare, 6 (6,8 %); Boyacá, 5 (5,7 %); Nariño, 4 (4,5 %), y Cesar, Magdalena, La Guajira y Cundinamarca, una (1,1 %) cada uno. Las 41 (46,6 %) restantes procedían de entes territoriales en los cuales no se ha confirmado la presencia de tuberculosis bovina (22): Tolima, 14 (15,9 %); Risaralda, 6 (6,8 %); Huila, 5 (5,7 %); Caldas, 4 (4,5 %); Arauca, 3 (3,4 %) y Bolívar, 3 (3,4 %), seguidos por Santander con 2 (2,3 %), Sucre con 2 (2,3 %), y Quindío y Bogotá, cada uno con 1 (1,1 %) (figura 1).

El análisis de las características sociodemográficas indicó que el 70,5 % de los casos se registró en hombres y 71 (80,7 %) residía en la cabecera municipal. En cuanto al tipo de afiliación al Sistema General de Seguridad Social en Salud, 57 (64,8 %) pertenecía al régimen subsidiado, 12 (13,6 %) se encontraba sin afiliación y el porcentaje restante pertenecía al régimen contributivo. En cuanto a la pertenencia étnica, 79 (89,8 %) se clasificó en la categoría de otros grupos étnicos. Al categorizar la edad por grupos, la mayor proporción (19,3 %) (n=17) de casos se concentró en los adultos jóvenes (de 25 a 34 años), seguido por el grupo de adulto medio (de 45 a 54 años), con 18,2 % (n=16), y el de adultos mayores (de 65 y más años), con 15,9 % (n=14) (cuadro 1).

En el 50 % (n=44) de las muestras se identificó la especie *M. tuberculosis*, en tanto que en las demás no se obtuvo amplificación del ADN.



Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias, Instituto Nacional de Salud, Colombia, 2015

Figura 1. Distribución geográfica de los casos con baciloscopia positiva y antecedentes de tratamiento de tuberculosis, Colombia, 2015

Discusión

Los casos analizados provenían de entidades territoriales que deben enviar al Laboratorio Nacional de Referencia las muestras de pacientes previamente tratados, como parte del esquema de vigilancia de la resistencia. No se recibieron muestras de los departamentos que habitualmente notifican un número importante de casos de tuberculosis, como Antioquia, Atlántico y Valle del Cauca (5), debido a que sus respectivas redes de laboratorios cuentan con pruebas rápidas y no requieren el apoyo del Laboratorio Nacional de Referencia.

Según la información del Instituto Colombiano Agropecuario, en Colombia la prevalencia de tuberculosis bovina es inferior al 1,0 % y, en general, en el país se ha evidenciado un descenso en el número de casos en los últimos años, con excepción de algunas áreas ubicadas en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca, donde se ha demostrado la persistencia de la circulación de *M. bovis* (23), lo cual representa un riesgo latente de zoonosis, no solo para los manipuladores directos de las fincas en saneamiento, sino también, para los manipuladores de la cadena productiva y para los consumidores finales.

Cuadro 1. Comportamiento de las características sociodemográficas de las personas con baciloscopia positiva y antecedentes de tratamiento de tuberculosis analizados para la identificación de *M. bovis*, Colombia, 2015

Variable	n	%
Sexo		
Hombre	62	70,5
Mujer	26	29,5
Total	88	100
Área de procedencia		
Cabecera municipal	71	80,7
Rural disperso	13	14,8
Centro poblado	4	4,5
Total	88	100
Régimen de afiliación al Sistema General de Seguridad Social en Salud		
Subsidiado	57	64,8
No asegurado	12	13,6
Sin información	11	12,5
Contributivo	7	8,0
Excepción	1	1,1
Total	88	100
Pertenencia étnica		
Otros	79	89,9
Indígena	4	4,5
Afrocolombiano, afrodescendiente, mulato	4	4,5
ROM, gitano	1	1,0
Total	88	100
Grupos de edad (años)		
<15	0	0,0
15 a 24	15	17,0
25 a 34	17	19,3
35 a 44	12	13,6
45 a 54	16	18,2
55 a 64	14	15,9
≥65	14	15,9
Total	88	100

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias, Instituto Nacional de Salud, Colombia, 2015

En cuanto al comportamiento según sexo y grupos de edad, los datos obtenidos fueron similares a la información oficial sobre la caracterización de la tuberculosis a nivel nacional, pues la mayor carga de la enfermedad se ha observado en la población masculina, principalmente en adultos jóvenes en edad productiva (5). El 80,7 % (n=71) de los casos estudiados provenía de zonas urbanas, lo que limita la posibilidad de identificar *M. bovis*, pues su presencia se relaciona con el contacto con animales enfermos y la manipulación de productos cárnicos o lácteos sin pasteurizar, actividades netamente agrícolas.

En cuanto al régimen de afiliación al sistema de salud, la mayoría de los casos (64,8 %; n=57) pertenecía al subsidiado y un porcentaje importante (13,6 %; n=12) no estaba asegurado, lo que demuestra que la mayor carga de la enfermedad se presenta en la población pobre que no cuenta con seguridad social, condición que agrava la situación del paciente, pues el tratamiento depende del suministro de medicamentos por parte del programa nacional de tuberculosis que, afortunadamente, ha tenido buenos resultados en el país en cuanto a su sostenibilidad y la permanencia de los pacientes. Sin embargo, un paciente que no esté vinculado al régimen de salud supone la misma condición para sus contactos, lo que favorece la diseminación del

bacilo, pues su captación, diagnóstico y tratamiento se hacen de manera más tardía, en comparación con los pacientes del régimen contributivo (24).

El Instituto Nacional de Salud ha hecho dos encuestas nacionales de vigilancia de la resistencia a los fármacos antituberculosos en cerca de 5.000 personas con tuberculosis pulmonar y baciloscopia positiva provenientes de todo el país. Las muestras de esputo se sembraron en medios Ogawa-Kudoh y Stonebrink modificado por Giraldo, este último con el fin de identificar si había circulación de *M. bovis*. No hubo ningún cultivo en el que se detectara esta especie, lo cual podría deberse a que la técnica de cultivo utilizada no es lo suficientemente sensible para detectar pocos bacilos, algo que es característico de esta especie (25,26).

En el 2012, el Grupo de Micobacterias de la Subdirección de Investigación e Innovación del Instituto Nacional de Salud detectó un caso de tuberculosis causado por *M. bovis* en un individuo de 58 años de edad, información que generó nueva evidencia sobre la presencia de esta micobacteria en humanos (27).

En el 2016, Leal, *et al.*, analizaron 164 muestras de esputo de trabajadores de fincas con circulación de *M. bovis* en ganado y no encontraron casos de tuberculosis debidos a este agente etiológico; los datos que obtuvieron son similares a los de este estudio, a pesar de que los grupos de población analizados eran diferentes en términos de la exposición reconocida (28).

En la región de las Américas se estima una prevalencia de tuberculosis por *M. bovis* de menos de 0,05 % (13). Según la OMS, en el 2013 se presentaron 231.330 casos, aunque esta cifra está subestimada debido a que en muchos países no se cuenta con técnicas de diferenciación de las especies del complejo *M. tuberculosis*, las cuales deben ser de comprobada sensibilidad y con suficiente poder discriminatorio, como la técnica de hibridación inversa de *spoligotyping*. En varios estudios de genómica comparativa, se ha evidenciado que las regiones de diferenciación presentes en *M. bovis* muestran una pérdida de material genético con relación a *M. tuberculosis*, lo que hace que su estudio permita conocer más sobre las relaciones filogenéticas de las especies que conforman el complejo (11,29,30).

Algunas de las limitaciones de este trabajo se relacionan con el número de muestras analizadas, ya que no es representativo del total de casos de tuberculosis notificados en ese periodo a nivel nacional. Además, la técnica empleada solo permitió identificar la especie en el 50 % (n=44) de las muestras, debido a que la prueba GenotypeMTBC™ no está recomendada para muestras con baciloscopia positiva. Por esta razón, no se descarta la posibilidad de que se presente esta zoonosis en los departamentos de Colombia analizados.

Se concluyó que la especie identificada en las muestras como causante de enfermedad fue *M. tuberculosis*. Para evidenciar la presencia de *M. bovis* como causante de tuberculosis en humanos, se requiere que las muestras provengan de personas con factores de riesgo, como manipuladores de ganado y productos cárnicos, médicos veterinarios, zootecnistas e individuos residentes en zonas con circulación de esta micobacteria. Tales muestras deben sembrarse en medios de cultivo que permitan el crecimiento de esta especie y, en caso de resultar positivas, deben evaluarse con técnicas que diferencien las especies del complejo.

En Colombia deben desarrollarse más estudios piloto encaminados a implementar nuevas estrategias de vigilancia para mejorar el diagnóstico por laboratorio y analizar variables como tipo de tuberculosis (pulmonar, extrapulmonar), lugar de residencia del individuo, ocupación, tipo de afiliación al Sistema General de Seguridad Social en Salud y estatus de HIV, entre otros aspectos analizados en estudios previos (28), como el tiempo de exposición del trabajador (permanencia de más de un año en la finca), el nivel de escolaridad, los conocimientos sobre la zoonosis y la cercanía con otros huéspedes, todo ello articulado con el Instituto Colombiano Agropecuario, para establecer una línea de base de la transmisión de *M. bovis* en humanos. Solo así se podrían diseñar políticas de salud pública para combatir este problema.

Agradecimientos

A los profesionales y a los laboratorios de salud pública que remitieron muestras al Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Nacional de Salud.

Referencias

1. Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. Clin Microbiol Rev. 2014;27:727-52. <https://doi.org/10.1128/CMR.00035-14>
2. Ramos DF, Silva AB, Fagundes MQ, von Groll A, Almeida PE, Dellagostin OA. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated in the south of Brazil. Braz J Microbiol. 2014;45:657-60. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000200039>
3. World Health Organization. Global Tuberculosis Report, 2016. Fecha de consulta: 5 de diciembre de 2017. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23098en/s23098en.pdf>
4. Zumla A, Granje J. Doing something about tuberculosis. BMJ. 1999;318:956-8. <https://doi.org/10.1136/bmj.318.7189.956>
5. Instituto Nacional de Salud. Informe del evento preliminar de tuberculosis, hasta el periodo epidemiológico XIII, Colombia, 2017. Fecha de consulta: 18 de abril de 2018. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/TUBERCULOSIS%20PE%20XIII%202017.pdf>
6. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg Infect Dis. 1998;4:59-70. <https://doi.org/10.3201/eid0401.980108>
7. Torres P, Soberanis O, Martínez A, Chávez B, Barrios MT, Torres M, et al. Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by *Mycobacterium bovis*. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002177>
8. Üller B, Durr S, Alonso S, Hattendorf J, Laisse C, Parsons S, et al. Zoonotic *Mycobacterium bovis* induced tuberculosis in humans. Emerg Infect Dis. 2013;19:899-908. <https://doi.org/10.3201/eid1906.120543>
9. Abalos P, Retamal P. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? Rev Sci Tech OffInt Epiz. 2004;23:583-94.
10. Pérez L, Navarro Y, García de Viedma D. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: A review. Res Vet Sci. 2014;97:S94-S100. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.008>
11. Kantor IN, Ambroggi M, Poggib S, Morcillo N, Da Silva MA, Osorio M, et al. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. Tuberculosis. 2008 88:358-65. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2007.11.007>
12. Pérez L, Millán F, Arriaga C, Romero C, Escartin M. Epidemiología molecular de la tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. Salud Pública Mex. 2008;50:286-91.
13. Kantor IN, LoBue PA, Thoen CO. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in the United States, Latin America and the Caribbean. Int J Tuberc Lung. 2010;14:1369-73.
14. Rivas C, Greif G, Coitinho C, Araújo L, Laserra P, Robello C. Primeros casos de tuberculosis pulmonar por *Mycobacterium bovis*. Una zoonosis reemergente en Uruguay. Rev Med Urug. 2012;28:209-14.

15. Park D, Qin H, Jain S, Preziosi M, Minuto J, Mathews C, *et al.* Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* patients coinfecting with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 2010;51:1343-6. <https://doi.org/10.1086/657118>
16. Hlavsa M, Moonan P, Cowan L, Navin T, Kammerer S, Morlock G, *et al.* Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clin Infect Dis.* 2008;47:168-75. <https://doi.org/10.1086/589240>
17. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35:907-14.
18. Aranaz A, Liébana E, Mateos A, Domínguez L, Vidal D, Domingo M, *et al.* Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: A tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1996;34:2734-40.
19. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. Cultivo. Fecha de consulta: 5 de diciembre de 2017. Disponible en: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo\[2\].pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo[2].pdf)
20. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. Baciloscopia. Fecha de consulta: 5 de diciembre de 2017. Disponible en: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-baciloscopia\[1\].pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-baciloscopia[1].pdf)
21. Hain Lifescience GmbH. Insertotécnica Genotype MTBC™ para la diferenciación de especies del complejo *M. tuberculosis*. Nehren, Alemania: Hain Lifescience GmbH; 2012.
22. Federación Colombiana de Ganaderos. Tuberculosis bovina. Fecha de consulta: 20 de abril de 2018. Disponible en: <http://www.fedegan.org.co/programas/tuberculosis-bovina>
23. Instituto Colombiano Agropecuario. Boletín epidemiológico anual, Colombia sanidad animal, 2014. Fecha de consulta: 20 de abril de 2018. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Epidemiologia-Veterinaria/Bol/Epi/Boletines-Anuales.aspx>
24. Ministerio de Salud y Protección Social. Programa Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis. Plan de monitoreo y evaluación. Fecha de consulta: 22 de diciembre de 2017. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/plan-monitoreo-evaluacion-tuberculosis.pdf>
25. León CI, Sierra C, Naranjo N, Garzón MC, Guerrero MI. Segundo estudio nacional de resistencia primaria de *M. tuberculosis* a las drogas antituberculosas en Colombia. *Infectio.* 2002;6:83.
26. Garzón MC, Angee DY, Llerena C, Orjuela D, Victoria J. Vigilancia de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos antituberculosos, Colombia 2004-2005. *Biomédica.* 2008;28:319-26. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v28i3.71>
27. Puerto G, Erazo L, Wintaco M, Castro C, Ribón W, Guerrero MI. *Mycobacterium tuberculosis* genotypes determined by spoligotyping to be circulating in Colombia between 1999 and 2012 and their possible associations with transmission and susceptibility to first-line drugs. *PLoS One.* 2015;10:e0124308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124308>
28. Leal AF, Castro CM, Wintaco LM, Villalobos R, Puerto GM. Tuberculosis por *Mycobacterium bovis* en trabajadores de fincas en saneamiento para tuberculosis bovina, de Antioquia, Boyacá y Cundinamarca. *Rev Salud Pública.* 2016;18:727-37. <https://doi.org/10.15446/rsap.v18n5.51187>
29. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997;35:907-14.
30. Arráiz N, Romay Z, Faría N, Mujica D. Identificación diferencial de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* por un ensayo de PCR múltiple. *Rev Cient.* 2006;16:622-8.

Artículo original

***Helicobacter pylori*: resistencia múltiple en pacientes de Bogotá, Colombia**

Azucena Arévalo^{1,2}, William Otero³, Alba Alicia Trespalacios¹

¹Laboratorio de Bacteriología Especial, Grupo de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

³Unidad de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La resistencia a los antibióticos es la principal causa del fracaso del tratamiento contra *Helicobacter pylori*; la claritromicina y el metronidazol son los antibióticos que generan mayor resistencia. En Colombia, la resistencia primaria a estos dos antibióticos y el uso excesivo de levofloxacina han alcanzado los límites aceptados (13,6, 83 y 16 %, respectivamente). A pesar de ello, se usa el tratamiento empírico combinando estos antibióticos en pacientes en los que ha fallado anteriormente.

Objetivo. Determinar la resistencia a los antibióticos en pacientes previamente tratados para *H. pylori* en Bogotá, Colombia.

Materiales y métodos. Se llevó a cabo un estudio descriptivo en el que se evaluó mediante dilución en agar la resistencia a la amoxicilina, la claritromicina, la levofloxacina y el metronidazol en 10 aislamientos provenientes de 5 pacientes con tres o cuatro tratamientos fallidos para *H. pylori*. La resistencia a los antibióticos se confirmó mediante secuenciación de ADN (Magrogen, Korea).

Resultados. Ocho de los aislamientos presentaron resistencia a dos o más antibióticos y todos fueron resistentes a la levofloxacina. Los patrones de sensibilidad de los aislamientos provenientes del antro pilórico y del cuerpo del estómago, fueron diferentes en tres de los pacientes.

Conclusión. Hasta donde se sabe, esta es la primera evidencia de resistencia múltiple de *H. pylori* en Colombia en pacientes previamente tratados. Los resultados evidenciaron las consecuencias del uso de un esquema ineficaz de tratamiento antibiótico y la necesidad de evaluar la sensibilidad a los antibióticos en diferentes sitios anatómicos del estómago. La resistencia múltiple limita el número de antibióticos útiles para erradicar *H. pylori*.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*; resistencia a múltiples medicamentos; antibacterianos; mutación; terapia.

Recibido: 05/04/18

Aceptado: 17/10/18

Publicado: 17/10/18

Citación:

Arévalo A, Otero W, Trespalacios AA. *Helicobacter pylori*: resistencia múltiple en pacientes de Bogotá, Colombia. Biomédica. 2019;39(Supl.1):125-34 <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4437>

Correspondencia:

William Otero, Calle 91 N° 19C-62, oficina 701, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (310) 779 9823
waoteror@gmail.com

Contribución de los autores:

William Otero: diseño del estudio
Azucena Arévalo: realización de los experimentos, recolección y análisis de los datos
Alba Alicia Trespalacios: análisis de los datos
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

Financiación:

Este trabajo fue apoyado por la Pontificia Universidad Javeriana, subvención 00004554, en el marco del proyecto: "Efecto del polimorfismo CYP2C19 en la erradicación de *Helicobacter pylori*".

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

***Helicobacter pylori*: Multiple resistance in patients from Bogotá, Colombia**

Introduction: The main cause for *Helicobacter pylori* infection treatment failure is antibiotic resistance, where clarithromycin and metronidazole play the main role. In Colombia, primary resistance as a consequence of the use of these two antibiotics and excessive levofloxacin use is above the accepted limit (13.6%, 83%, and 16%, respectively). Despite this fact, empirical therapies that include the combination of these antibiotics are used in patients with previous therapeutic failure.

Objective: To determine antibiotic resistance in patients previously treated for *H. pylori* in Bogotá, Colombia.

Materials and methods: We conducted a descriptive study that included ten isolates obtained from five patients with three or four previous failed treatments for *H. pylori*. Antibiotic resistance to amoxicillin, clarithromycin, levofloxacin, and metronidazole was investigated by agar dilution and confirmed by DNA sequencing (Magrogen, Korea).

Results: Eight isolates were resistant to two or more antibiotics. All isolates were resistant to levofloxacin. Susceptibility patterns in isolates from the gastric antrum and the body of the stomach were different in three patients.

Conclusion: As far as we know, this is the first evidence of multiple *H. pylori* resistance in Colombia in previously treated patients. Results demonstrated the consequences of using an ineffective antibiotic scheme and the need to assess antibiotic susceptibility in different anatomical sites of the stomach. The consequences of multiple resistance decrease possible antibiotic effectiveness to eradicate *H. pylori* in the future.

Keywords: *Helicobacter pylori*; drug resistance, multiple; anti-bacterial agents; susceptibility test; mutation; therapy.

Helicobacter pylori es una bacteria microaerófila Gram negativa capaz de colonizar la mucosa gástrica; causa gastritis crónica en el 100 % de las personas infectadas, úlceras gástricas en 10 a 20 %, linfoma de tejido linfoide asociado con la mucosa gástrica (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*, MALT) en menos del 1 % y adenocarcinoma gástrico distal en 1 a 2 %.

Helicobacter pylori es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico y ha sido clasificado como carcinógeno de tipo I por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1,2), por lo cual, los expertos mundiales recomiendan que debe erradicarse siempre (3,4). Sin embargo, a nivel mundial existe preocupación porque la eficacia de los tratamientos de primera línea comúnmente empleados es inferior al 80 % (5), lo cual también ocurre en Colombia, como quedó demostrado en un estudio de Trespalacios, *et al.* (Trespalacios S, Otero W, Mercado M. Efficacy of first-line *Helicobacter pylori* eradication treatment with two triple regimens with levofloxacin. *Gastroenterology*. 2014;S-741-2. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(14\)62685-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(14)62685-8)).

Si bien el éxito terapéutico responde a múltiples factores ambientales o relativos al huésped, como el incumplimiento del tratamiento, y a la presencia de polimorfismos en la interleucina 1B (IL-1B) en enzimas involucradas en el metabolismo de los medicamentos (CYP2C19 y CYP3A4) y en el de las bacterias, se ha demostrado que la principal causa del fracaso del tratamiento es la resistencia bacteriana (6). Por ello, en febrero de 2017, la OMS incluyó a *H. pylori* en la lista de los 16 microorganismos que amenazan a la humanidad y ameritan urgentes medidas de control, clasificándolo en la categoría de más alta prioridad, debido al aumento de la resistencia a los antibióticos de primera línea, metronidazol y claritromicina, especialmente a este último (7), y a la aparición de aislamientos multirresistentes.

A nivel mundial, hay pocos estudios sobre la multirresistencia de *H. pylori*, es decir, la resistencia a tres o más antibióticos, pero se estima que aproximadamente 15 % de los aislamientos clínicos la presentan; esto implica una disminución de la tasa de erradicación y, por lo tanto, una grave amenaza para la salud humana (8). En el caso de *H. pylori*, la multirresistencia se da simultáneamente frente a amoxicilina, metronidazol y claritromicina (9,10).

En general, *H. pylori* se hace resistente a amoxicilina, claritromicina, metronidazol, levofloxacina y tetraciclina, principalmente, mediante mutaciones puntuales en un par de bases del gen que codifica para el sitio de acción del antibiótico, o por acción de las bombas de expulsión bacterianas, que normalmente protegen al microorganismo de la toxicidad de los antibióticos (11-18). Las bombas de expulsión son un complejo estructural de proteínas en la membrana interna de las bacterias, que actúa en sincronía con proteínas adaptadoras del periplasma y canales presentes en la membrana externa, las cuales expulsan eficientemente los medicamentos (19). Dichas proteínas se asocian, especialmente, con el desarrollo de multirresistencia, como en el caso de la codificada por el gen *hefA* ($p=0,003$) (20).

En Colombia, la resistencia primaria a claritromicina, metronidazol y levofloxacina es alta, de 13,6, 81 y 27 %, respectivamente (14,21,22); esto limita su utilización en los tratamientos empíricos de primera línea. Sin embargo, son escasos los estudios en pacientes en quienes ya ha fracasado el tratamiento, pues, a menudo, se excluyen de los estudios de

sensibilidad (23). Además, el número cada vez mayor de tratamientos de erradicación puede haber resultado en que no se investiguen más pacientes con infecciones resistentes al tratamiento (23). Sin embargo, la vigilancia de la presencia de aislamientos de *H. pylori* multirresistente es esencial para permitir el uso racional de los antibióticos después de repetidos fracasos terapéuticos, especialmente en lugares donde no se dispone de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos (24).

En este contexto, el objetivo de este estudio fue analizar los aislamientos clínicos *H. pylori* de pacientes con varias fallas terapéuticas previas en Bogotá, Colombia.

Materiales y métodos

Tipo de estudio y pacientes

Se llevó a cabo un estudio descriptivo en el que se incluyeron 5 pacientes que fueron previamente excluidos de un ensayo clínico de 355 pacientes (26) debido a que habían recibido tratamiento previo para *H. pylori*. A los 5 pacientes incluidos en este estudio se les realizó endoscopia de vías digestivas altas en diferentes centros de Bogotá entre febrero y noviembre de 2014. Los motivos de consulta fueron dispepsia y reflujo en cinco pacientes, así como una historia de infección por *H. pylori* de difícil tratamiento, de 2 a 14 años de evolución.

Después de la explicación médica sobre el procedimiento endoscópico y sobre el estudio, los pacientes firmaron el consentimiento informado. Posteriormente, se hizo la endoscopia de vías digestivas altas después de un ayuno mínimo de seis horas (21). Se tomaron biopsias de rutina para el estudio de la gastritis crónica, según el protocolo propuesto por Rugge, *et al.* (25), y biopsias adicionales para el cultivo de *H. pylori*: cuatro biopsias del antro y cuatro del cuerpo del estómago. Una de las biopsias de antro se sometió a la prueba rápida de ureasa.

Transporte de muestras y cultivo

Las biopsias del antro y el cuerpo gástricos destinadas al cultivo de *H. pylori*, se colocaron en 500 µl de caldo *Brucella* (Beckton Dickenson) con suplemento de 20 % (p/v) de glicerol (Invitrogen) y se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento. Los aislamientos de *H. pylori* obtenidos y las biopsias restantes, se mantuvieron a -70 °C (21).

Las biopsias se maceraron en condiciones asépticas y estériles, con un aplicador de madera previamente tratado en solución de carbón activado al 1 % (p/v), hasta que se logró la homogeneidad total (21). Posteriormente, se sembraron en agar *Brucella* (Beckton Dickenson) con suplemento de IsoVitaleX™ al 4 % (v/v), 7 % (v / v) de sangre de caballo y 2 ml de suplemento selectivo para *H. pylori*, DENT™ (Thermo Scientific Oxoid, UK).

Los cultivos se incubaron a 37 °C en condiciones microaerófilas durante 3 a 14 días. Después de la incubación, se observaron pequeñas colonias transparentes que se sometieron a identificación fenotípica mediante coloración de Gram (bacilos curvos Gram negativos), oxidasa (positiva), catalasa (positiva) y prueba rápida de ureasa (positiva) (21). Posteriormente, se obtuvieron cultivos puros, para lo cual se aislaron las colonias con las características apropiadas en agar *Brucella* y se incubaron a 37 °C en condiciones de microaerofilia durante tres a cinco días.

Pruebas de sensibilidad fenotípica y genotípica

La sensibilidad fenotípica a *H. pylori* se evaluó a partir de cultivos puros para amoxicilina, claritromicina, levofloxacina y metronidazol mediante la prueba de dilución en agar, según las recomendaciones de los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (26,27). Los puntos de corte utilizados para determinar la resistencia fueron ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ para amoxicilina, claritromicina y levofloxacina, y 8 $\mu\text{g/ml}$ para metronidazol (27-31). Como control se usó la cepa de *H. pylori* NCTC 11637.

Además, los aislamientos se analizaron genotípicamente para identificar posibles mutaciones asociadas con la resistencia y confirmar la sensibilidad fenotípica. Se usó DNAzol™ (Invitrogen) para extraer el ADN genómico de las colonias de *H. pylori* aisladas del antro y del cuerpo del estómago.

Posteriormente, se amplificaron los genes bacterianos relacionados con la resistencia a la amoxicilina (*pbp1A*), la claritromicina (*rna23s*), la levofloxacina (*gyrA*) y el metronidazol (*rdxA*), mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, según protocolos previamente estandarizados (14,22) (cuadro 1).

Cuadro 1. Genes analizados y secuencia de los iniciadores utilizados identificación de *M. bovis*, Colombia, 2015

Antibiótico	Gen	Iniciadores	Tamaño (bp)	Referencia
Amoxicilina	<i>pbp1A</i>	F: GCT ATT CCA CGA CTT CTA AA R: GCA AGG TTA CAA GCC CTA AA	380	(12)
Claritromicina	<i>23S rDNA</i>	F: CCA CAG CGA TGT GGT CTC AG R: CTC CAT AAG AGC CAA AGC CC	425	(32)
Levofloxacina	<i>gyrA</i>	F: TTT RGC TTA TTC MAT GAG CGT R: RGCA GAC GGC TTG GTA RAA TA	428	(33)
Metronidazol	<i>rdxA</i>	F: GACAATTATTAACGAGCGC R: CCTCCAATAATGCAACTATC	460	(15)

^a Iniciadores utilizados para la PCR convencional con el tamaño del producto amplificado en pares de bases (bp)

Análisis bioinformático

La sensibilidad genotípica y las mutaciones relacionadas con la resistencia a los antibióticos, se determinaron con la ayuda de análisis bioinformáticos. Las mutaciones asociadas con la resistencia a la claritromicina se detectaron con la herramienta bioinformática BLAST-N (*Basic Local Alignment Search Tool-N*). Para analizar las secuencias de detección de mutaciones relacionadas con la resistencia a amoxicilina, levofloxacina y metronidazol se utilizó la BLAST-X. Se empleó la secuencia de referencia proveniente de *H. pylori* 26695 (taxid: 85962), número de acceso a GenBank CP003904.1.

Estadística

Los resultados se analizaron mediante estadística descriptiva.

Resultados

Distribución de los pacientes

Durante el 2014, 5 de los pacientes remitidos a endoscopia de vías digestivas habían recibido varios tratamientos contra *H. pylori* sin éxito: cuatro

hombres y una mujer entre los 41 y los 57 años de edad. Todos informaron tener antecedentes familiares de enfermedades gástricas. Cuatro (4/5) refirieron tener antecedentes familiares de gastritis y, uno (1/5), antecedentes de úlcera péptica. Un paciente (1/5) refirió antecedentes familiares de cáncer gástrico y, tres (3/5), de otros tipos de tumores gastrointestinales, como cáncer de esófago, cáncer de páncreas y linfoma MALT (cuadro 2).

Cuadro 2. Distribución, principales características e historia familiar de los pacientes

No.	Sexo	Edad (años)	IMC	Número de tratamientos	Motivo de consulta	Evolución (años)	Historia familiar		
							Enfermedad gástrica	Cáncer gástrico	Otros cánceres
1	Masculino	45	29,0	4	<i>H. pylori</i> difícil de tratar, dispepsia y ERGE	14	Gastritis	No	Esófago
2	Femenino	51	26,7	4	<i>H. pylori</i> difícil de tratar, dispepsia y ERGE	14	Gastritis	No	No
3	Masculino	42	24,6	3	<i>H. pylori</i> difícil de tratar, dispepsia y ERGE	10	Gastritis	No	Linfoma MALT
4	Masculino	57	24,2	3	<i>H. pylori</i> difícil de tratar y úlcera	SD	Úlcera péptica	Sí	No
5	Masculino	41	25,4	4	<i>H. pylori</i> difícil de tratar, dispepsia y ERGE	2	Gastritis	No	Páncreas

ERGE: reflujo gastroesofágico; IMC: índice de masa corporal; SD: sin dato

Pruebas de sensibilidad fenotípica y genotípica

Todos los aislamientos de los pacientes tuvieron resultados positivos en la prueba rápida de ureasa. Se obtuvieron diez aislamientos de antro y de cuerpo del estómago (cinco de antro y cinco de cuerpo). A todos los aislamientos se les hizo antibiograma para amoxicilina, claritromicina, levofloxacina y metronidazol, mediante dilución en agar.

Según el análisis de sensibilidad fenotípica, en un solo paciente se obtuvieron dos aislamientos de *H. pylori* (uno del cuerpo del estómago y otro del antro) resistentes a la amoxicilina. Los aislamientos de tres de los pacientes fueron resistentes a la claritromicina (tres del cuerpo y dos del antro); en cuatro de los pacientes, se encontraron aislamientos resistentes al metronidazol (cuatro del cuerpo y tres del antro). Por último, los aislamientos de todos los pacientes fueron resistentes a la levofloxacina (cuadro 3).

Cuadro 3. Sensibilidad a los antibióticos

Antibiótico	Amoxicilina				Claritromicina				Levofloxacina				Metronidazol			
	Antro		Cuerpo		Antro		Cuerpo		Antro		Cuerpo		Antro		Cuerpo	
Sitio anatómico del estómago	CIM	SG	CIM	SG	CIM	SG	CIM	SG	CIM	SG	CIM	SG	CIM	SG	CIM	SG
Sensibilidad	($\mu\text{g/ml}$)	(ppb1A)	($\mu\text{g/ml}$)	(ppb1A)	($\mu\text{g/ml}$)	(rna23S)	($\mu\text{g/ml}$)	(rna23S)	($\mu\text{g/ml}$)	(gyrA)	($\mu\text{g/ml}$)	(gyrA)	($\mu\text{g/ml}$)	(rdxA)	($\mu\text{g/ml}$)	(rdxA)
Paciente 1	0,062	TS	0,25	TS	0,016	TS	0,125	TS	64	N87I	32	N87I	1	SD	16	SD
Paciente 2	0,125	TS	0,125	TS	0,125	TS	64	SD	8	N87K	2	N87K	8	SD	16	SD
Paciente 3	0,016	TS	0,062	TS	0,125	TS	0,5	TS	1	N87I	4	N87I	1	SD	0,5	SD
Paciente 4	0,25	SD	0,25	SD	8	A2143G	32	A2143G	2	SD	4	SD	4	TS	64	TS
Paciente 5	1	E406V	1	SD	64	A2143G	64	A2143G	4	D91N	4	D91N	16	R90K	16	R90K

CIM: concentración inhibitoria mínima; SG: sensibilidad genotípica; TS: tipo silvestre; SD: sin datos

Se estudiaron las mutaciones asociadas con resistencia a amoxicilina, claritromicina, levofloxacina y metronidazol, determinando su presencia en los genes *pbp1A*, *rna23s* y *gyrA*, aunque en algunos aislamientos no fue posible analizar las secuencias debido a su mala calidad (cuadro 3).

Las mutaciones relacionadas con resistencia a los antibióticos evaluados, fueron la E406V para la amoxicilina y la A2143G para la claritromicina. Para el metronidazol, se detectó la mutación R90K en la proteína *rdxA* y, para la levofloxacina, se detectaron tres cambios diferentes en la proteína *gyrA* en las posiciones 87 y 91, así: N87I, N87K y D91N (cuadro 3).

Se detectó resistencia múltiple en ocho de los diez aislamientos. Dos de ellos (uno de antro y otro de cuerpo provenientes del mismo paciente) presentaron resistencia a dos antibióticos: levofloxacina y metronidazol. Cuatro aislamientos de antro y cuerpo de dos pacientes diferentes, fueron resistentes a tres antibióticos: claritromicina, levofloxacina y metronidazol. Dos aislamientos de otro paciente presentaron resistencia a los cuatro antibióticos: amoxicilina, claritromicina, levofloxacina y metronidazol (cuadro 3). Además, se detectaron diferencias entre los aislamientos de antro y de cuerpo, en los patrones de resistencia en cuatro pacientes, lo que indicaría una infección concomitante con diferentes cepas de *H. pylori* (cuadro 3).

Discusión

Estos resultados evidencian que en Bogotá se registraron aislamientos de *H. pylori* con resistencia a múltiples antibióticos después de tres años (2012-2015) de vigilancia. La aparición de multirresistencia podría ser la consecuencia de tratamientos previos fallidos, o de resistencia 'secundaria' a claritromicina, metronidazol y levofloxacina debida al uso extensivo de estos antibióticos en el tratamiento de enfermedades respiratorias, parasitarias o ginecológicas, y de infecciones urinarias, respectivamente (34,35). Estos hallazgos implicarían que dichos antibióticos no deberían utilizarse empíricamente en los tratamientos de primera línea, por lo menos en Bogotá. Resultados similares se han registrado en otros países como Alemania, Bulgaria, Polonia, Brasil, Israel, China y Corea (23,24,36-38), en donde se encontraron resistencias secundarias múltiples a claritromicina, metronidazol y levofloxacina, con una mayor prevalencia de resistencia a claritromicina y metronidazol.

Los aislamientos del cuerpo y del antro presentaron diferentes patrones de sensibilidad, lo cual también se ha reportado previamente en Corea, China y Alemania (39-41). Este hallazgo explicaría el fracaso del tratamiento y no solo indicaría la presencia de más de una cepa de *H. pylori*, sino que subrayaría la importancia metodológica de hacer la prueba de sensibilidad a partir de muestras de ambos segmentos del estómago, con el fin de orientar mejor la elección del tratamiento y evitar recaídas de infección por *H. pylori*.

Los resultados del presente estudio resaltan la importancia de implementar pruebas de sensibilidad, ya sea mediante cultivo o biología molecular, antes de un primer tratamiento para *H. pylori*, con el fin de orientar las terapias de primera línea, lo que concuerda con lo reportado por Park, *et al.* (38), en cuyo estudio se evidencia que, cuando el tratamiento de primera línea se administra teniendo en cuenta la sensibilidad a los antibióticos, la eficacia es superior a la del tratamiento empírico. Con la prueba previa de sensibilidad, la eficacia fue de 94,7 % (IC_{95%} 88,8-100) y por protocolo fue de 96,4 % (IC_{95%} 91,5-100) y, con el tratamiento empírico fueron de 71,9 % (IC_{95%} 60,2-83,5) y 73,2 % (IC_{95%} 61,5-84,8), respectivamente (38). No obstante, cuando ya

han fallado varios tratamientos, la utilidad del cultivo no es la misma debido a la aparición de resistencia, lo cual se suma a que el cultivo y las pruebas moleculares no están disponibles en todas partes y, por lo tanto, lo usual es recurrir a tratamientos empíricos (42), caso en que debería tenerse en cuenta la epidemiología de la resistencia local.

En Colombia, el tratamiento triple de primera línea se utilizó en el pasado, combinando amoxicilina, claritromicina o metronidazol o levofloxacina (43). Sin embargo, en otros estudios, se ha demostrado frecuentemente resistencia primaria a estos antibióticos (22), por lo cual ya no se recomiendan como una primera opción en el país (43).

El tratamiento empírico con estos antibióticos, sin tener en cuenta la epidemiología local, con frecuencia conduce al fracaso terapéutico (38). Además, cuando hay resistencia a la claritromicina y al metronidazol, los tratamientos híbridos y concomitantes con esos antibióticos fracasan frecuentemente (35). En estos casos, la eficacia de los tratamientos triple, secuencial y concomitante, es de ~50 %, <20 % y 50 %, respectivamente (44). En el informe del consenso Maastricht V/Florence (*Maastricht V/Florence Consensus Report*) se recomienda no usar tratamientos secuenciales ni concomitantes, sino cuádruples durante 14 días, en casos de resistencia simultánea a la claritromicina y el metronidazol superior al 15 % (4,43); entre estos, están el que combina bismuto y furazolidona, más metronidazol o amoxicilina-tetraciclina, o los tratamientos con rifabutina (tratamiento de rescate), que también son una alternativa (45). La combinación de amoxicilina y tetraciclina tiene, generalmente, muy baja tasa de éxito: 62 a 75 % por intención de tratar y 64 a 80 % por protocolo.

Su escaso éxito podría deberse a la interacción del efecto bacteriostático de la tetraciclina con el efecto bactericida de la amoxicilina (45). La acción bactericida de la amoxicilina implica la inhibición de la formación de la pared celular, que depende de la tasa de proliferación de las bacterias (45). Los antibióticos bacteriostáticos, como la tetraciclina, pueden reducir la efectividad de la penicilina mediante la inhibición de la síntesis de proteínas celulares requerida para la división celular (45).

Se han explorado nuevas opciones terapéuticas para los casos de multiresistencia, entre ellas, el linezolid (46) y los nuevos análogos de las oxazolidionas (47). No obstante, el inconveniente es que el linezolid podría inducir la aparición de *Staphylococcus* spp. resistentes a su acción, por lo que la decisión sobre su uso requiere de más estudios (46,47).

Los resultados del presente estudio evidenciaron la presencia de *H. pylori* con resistencia a múltiples antibióticos utilizados en los tratamientos empíricos, principalmente a claritromicina, levofloxacina y metronidazol, en ocho de diez aislamientos. Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos deben hacerse, preferiblemente, antes de administrar el primer tratamiento para *H. pylori*, en cuyo caso se sugiere hacerlas con muestras provenientes del antro y del cuerpo del estómago, para evitar que se pierdan aislamientos resistentes a los antibióticos en ambos sitios. Cuando hay *H. pylori* con resistencia a múltiples antibióticos, las opciones terapéuticas se restringen a los tratamientos cuádruples de rescate con furazolidona o rifabutina.

Agradecimientos

Agradecemos a los pacientes por su interés en participar en el estudio.

Referencias

1. Otero W, Gómez M, Castro D. Gastric carcinogenesis. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2009;24:314-29.
2. IARC *Helicobacter pylori* Working Group. *Helicobacter pylori* eradication as a strategy for preventing gastric cancer. Lyon: International Agency for Research in Cancer; 2014. p. 1-59.
3. Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, Graham DY, El-Omar EM, Miura S, *et al*. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*. 2015;64:1-15. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309252>
4. Malfertheiner P, Megraud F, Morain CAO, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, *et al*. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*. 2017;66:6-30. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>
5. Savoldi A, Carrara E, Graham DY, Conti M, Tacconelli E. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: A systematic review and meta-analysis in World Health Organization Regions. *Gastroenterology*. 2018 *Gastroenterol*. 2018;155:1372-82. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.007>
6. Zhang M. High antibiotic resistance rate: A difficult issue for *Helicobacter pylori* eradication treatment. *World J Gastroenterol*. 2015;21:13432-7. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i48.13432>
7. Organización Mundial de la Salud. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Fecha de consulta: 13 de octubre de 2018. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
8. Hu Y, Zhang M, Lu B, Dai J. *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance, a continuing and intractable problem. *Helicobacter*. 2016;21:349-63. <https://doi.org/10.1111/hel.12299>
9. Wueppenhorst N, Stueger HP, Kist M, Glocker E. Identification and molecular characterization of triple- and quadruple-resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates in Germany. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63:648-53. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp003>
10. Otth L, Wilson M, Fernández H, Otth C, Toledo C, Cárcamo V, *et al*. Isolation of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa and susceptibility to five antimicrobial drugs in southern Chile. *Braz J Microbiol*. 2011;42:442-7. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000200005>
11. De Francesco V, Giorgio F, Ierardi E, Zotti M, Neri M, Milano A, *et al*. Primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*: The multicentric Italian clarithromycin resistance observational (MICRO) study. *J Gastrointest Liver Dis*. 2011;20:235-9.
12. Gerrits MM, Schuijffel D, van Zwet AA, Kuipers EJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG. Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:2229-33. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.7.2229-2233.2002>
13. Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M. Mutations in penicillin-binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61:995-8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn051>
14. Trespalacios AA, Otero W, Caminos JE, Mercado MM, Ávila J, Rosero LE, *et al*. Phenotypic and genotypic analysis of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from Bogotá D.C., Colombia. *J Microbiol*. 2013;51:448-52. <https://doi.org/10.1007/s12275-013-2465-6>
15. Kwon DH, Peña JA, Osato MS, Fox JG, Graham DY, Versalovic J. Frameshift mutations in *rdxA* and metronidazole resistance in North American *Helicobacter pylori* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2000;46:793-6.
16. Gerrits MM, Zoete MR De, Arents NL, Kuipers EJ, Kusters JG. 16S rRNA mutation-mediated tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:2996-3000. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.9.2996-3000.2002>
17. Zhang Z, Liu Z, Zheng P, Tang F, Yang P. Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*. 2010;16:1279-84. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i10.1279>
18. Kutschke A, de Jonge BLM. Compound efflux in *Helicobacter pylori* compound efflux in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:3009-11. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.3009-3010.2005>
19. Falsafi T, Ehsani A, Attaran B, Niknam V. Association of *hp1181* and *hp1184* genes with the active efflux phenotype in multidrug-resistant isolates of *Helicobacter pylori*. *Jundishapur J Microbiol*. 2016;20:e30726. <https://doi.org/10.5812/ijm.30726>

20. Liu Z, Zheng P, Yang P. Efflux pump gene *hefA* of *Helicobacter pylori* plays an important role in multidrug resistance. *World J Gastroenterol*. 2008;14:5217-22. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.5217>
21. Trespalacios AA, Otero Regino W, Mercado Reyes M. *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin and amoxicillin in Colombian patients. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2010;25:31-8.
22. Trespalacios AA, Otero W, Arévalo GA, Poutou RA, Rimbara E, Graham DY. Surveillance of levofloxacin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Bogotá-Colombia (2009-2014). *PLoS ONE*. 2016;11:1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160007>
23. Heep M, Kist M, Strobel S, Beck D, Lehn N. Secondary resistance among 554 isolates of *Helicobacter pylori* after failure of therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19:538-41.
24. Boltin D, Ben-Zvi H, Perets TT, Kamenetsky Z, Samra Z, Dickman R, *et al*. Trends in secondary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* from 2007 to 2014: Has the tide turned? *J Clin Microbiol*. 2015;53:522-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.03001-14>
25. Ruge M, Correa P, Di Mario F, El-Omar E, Fiocca R, Geboes K, *et al*. OLGA staging for gastritis: A tutorial. *Dig Liver Dis*. 2008;40:650-8. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2008.02.030>
26. Patel JB, Cockerill III FR, Alder J, Bradford PA, Eliopoulos GM, Hardy DJ, *et al*. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Wayne: CLSI; 2014. p. 1-230.
27. Wikler MA, Bush K, Cockerill III FR, Dudley MN, Eliopoulos GM, Hardy DJ, *et al*. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighteenth Informational Supplement. Wayne: CLSI; 2008. p. 1-188.
28. Mégraud F. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* infection. *Br J Bull*. 1998;54:207-16.
29. Mégraud F, Bénéjat L, Nina E, Ngoyi O, Lehours P. Molecular approaches to identify *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance. *Gastroenterol Clin North Am*. 2015;44:577-96. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2015.05.002>
30. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:280-322. <https://doi.org/10.1128/CMR.00033-06>
31. Glocker E, Stueger H, Kist M. Quinolone resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Germany. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:346-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.00614-06>
32. Kim KS, Kang JO, Eun CS, Han DS, Choi TY. Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. *J Korean Med Sci*. 2002;17:599-603. <https://doi.org/10.3346/jkms.2002.17.5.599>
33. Tankovic J, Lascols C, Sculo Q, Petit J. Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low- and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:3942-4. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3942-3944.2003>
34. Ogata SK, Godoy APO, da Silva Patricio FR, Kawakami E. High *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole and clarithromycin in Brazilian children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;56:645-8. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31828b3669>
35. Mégraud F. Current recommendations for *Helicobacter pylori* therapies in a world of evolving resistance. *Gut Microbes*. 2013;4:541-8. <https://doi.org/10.4161/gmic.25930>
36. Boyanova L. Prevalence of multidrug-resistant *Helicobacter pylori* in Bulgaria. *J Med Microbiol*. 2009;58:930-5. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.009993-0>
37. Karczewska E, Wojtas-bonior I, Sito E, Budak A. Primary and secondary clarithromycin, metronidazole, amoxicillin and levofloxacin resistance to *Helicobacter pylori* in southern Poland. *Pharmacol Rep*. 2011;63:799-807.
38. Park CS, Lee SM, Park CH, Koh HR, Jun CH, Park SY, *et al*. Pretreatment antimicrobial susceptibility-guided vs. clarithromycin-based triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication in a region with high rates of multiple drug resistance. *Am J Gastroenterol*. 2014;109:1595-602. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.222>
39. Selgrad M, Tammer I, Langner C, Bornschein J, Meißle J, Kandulski A, *et al*. Different antibiotic susceptibility between antrum and corpus of the stomach, a possible reason for treatment failure of *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*. 2014;20:16245-51. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.16245>
40. Yakoob J, Fan X, Hu G, Yang H, Liu L, Liu S, *et al*. Polyclonization of *Helicobacter pylori* among Chinese subjects. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7:187-92. <https://doi.org/10.1046/j.1198-743x.2001.00226.x>

41. Kim JJ, Kim JG, Kwon DH. Mixed-infection of antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* isolates in a single patient and underestimation of antimicrobial susceptibility testing. *Helicobacter*. 2003;8:202-6. <https://doi.org/10.1046/j.1523-5378.2003.00145.x>
42. Otero W, Gómez M, Otero L, Trespalacios A. *Helicobacter pylori*: ¿cómo se trata en el 2018? *Rev Gastroenterol Peru*. 2018;38:54-63.
43. Otero W, Trespalacios AA, Otero L, Vallejo M, Torres M, Pardo R, et al. Guía práctica para el diagnóstico y tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* en adultos. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2015;30(Supl.1):17-33.
44. Graham DY, Lee YC, Wu MS. Rational *Helicobacter pylori* therapy: Evidence-based medicine rather than medicine-based evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12:177-86. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.05.028>
45. Wu IT, Chuah SK, Lee CH, Liang CM, Lu LS, Kuo YH, et al. Five-year sequential changes in secondary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Taiwan. *World J Gastroenterol*. 2015;21:10669-74. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i37.10669>
46. Boyanova L, Evstatiev I, Gergova G, Yaneva P, Mitov I. Linezolid susceptibility in *Helicobacter pylori*, including strains with multidrug resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;46:703-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.08.010>
47. Shi J, Jiang Y, Zhao Y. Promising in vitro and in vivo inhibition of multidrug-resistant *Helicobacter pylori* by linezolid and novel oxazolidinone analogues. *J Glob Antimicrob Resist*. 2016;7:106-9. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.07.016>

Original article

Detection of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from river waters flowing to the Guanabara Bay and from clinical samples of hospitals in Rio de Janeiro, Brazil

Verônica Dias Gonçalves¹, Frederico Meirelles-Pereira², Márcio Cataldo¹, Bianca de Oliveira Fonseca¹, Barbara Araujo Nogueira¹, Julianna Giordano Botelho Olivella¹, Francisco de Assis Esteves², Ana Luiza Mattos-Guaraldi¹, Arnaldo Feitosa Braga de Andrade¹, Alexandre Ribeiro Bello¹, José Augusto Adler Pereira¹

¹ Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

² Laboratório de Limnologia, Departamento de Ecologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Introduction: The use of antibiotics in humans, animal husbandry and veterinary activities induces selective pressure leading to the colonization and infection by resistant strains.

Objective: We evaluated water samples collected from rivers of the Guanabara Bay, which have suffered minor and major environmental degradation, and clinical samples of hospital origin to detect evidence of the presence of resistance genes to aminoglycosides, beta-lactam antibiotics and fluoroquinolones in strains of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* and *Escherichia coli*.

Materials and methods: For isolation of the water strains we employed culture media containing 32 µg/ml cephalotin and 8 µg/ml gentamicin. The strains from clinical materials were selected using culture media containing 8 µg/ml gentamicin. The strains were identified and subjected to antimicrobial susceptibility testing (AST), plasmid DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) to detect genes encoding enzymes modifying aminoglycosides (EMA), extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and plasmid mechanisms of quinolone resistance (PMQR).

Results: The AST of the isolates recovered from water samples showed multidrug-resistance profiles similar to those found in isolates recovered from clinical materials. All isolates from water samples and 90% of the isolates from clinical samples showed at least one plasmid band. In the PCR assays, 7.4% of the isolates recovered from water samples and 20% of those from clinical materials showed amplification products for the three antimicrobial classes.

Conclusion: We believe that the detection of microorganisms presenting genetic elements in environments such as water is necessary for the prevention and control of their dissemination with potential to infect humans and other animals in eventual contact with these environments.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; *Escherichia coli*; drug resistance, multiple; plasmids; waste water; Brasil.

Detección de enterobacterias multirresistentes aisladas en aguas de los ríos que desembocan en la bahía de Guanabara y en muestras de hospitales de Río de Janeiro, Brasil

Introducción. El uso de antibióticos en seres humanos, en la industria pecuaria y en las actividades veterinarias induce una presión selectiva que resulta en la colonización e infección con cepas resistentes.

Objetivo. Determinar la presencia de genes de resistencia a aminoglucósidos, betalactámicos y fluoroquinolonas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* y *Escherichia coli*, obtenidas de muestras de agua de los ríos que desembocan en la bahía de Guanabara y de muestras clínicas de hospitales de Río de Janeiro.

Materiales y métodos. En la selección de las cepas resistentes obtenidas de las muestras de agua de los ríos, se emplearon medios de cultivo que contenían 32 µg/ml de cefalotina y 8 µg/ml de gentamicina. En el caso de las muestras de especímenes clínicos, se usaron medios de cultivo que contenían 8 µg/ml de gentamicina. Las cepas se identificaron y se sometieron a pruebas de sensibilidad antimicrobiana, extracción de ADN plasmídico y pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar los genes que codifican aquellas enzimas que modifican los aminoglucósidos, las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y los mecanismos de resistencia a las quinolonas mediados por plásmidos.

Received: 05/04/18

Accepted: 24/10/18

Published: 13/12/18

Citation:

Dias-Gonçalves V, Meirelles-Pereira F, Cataldo M, de Oliveira-Fonseca B, Araujo-Nogueira B, Botelho-Olivella JG, *et al.* Detection of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from river waters flowing to the Guanabara Bay and from clinical samples of hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Biomédica. 2019;39(Supl.1):135-49

<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i0.4391>

Corresponding author:

Verônica Dias Gonçalves, Departamento de Microbiologia, Imunología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. Professor Manuel de Abreu, 444/3^o andar, CEP: 20550-170, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
Teléfono: (+55) (21) 2868 8280; fax: (+55) (21) 2868 8376
kaiura@bol.com.br

Author contributions:

The manuscript was drafted from the development of the doctoral thesis of Verônica Dias Gonçalves, who had the guidance and cooperation of the other ten authors regarding data analysis and interpretation, writing, critical review, and final approval of this version. All authors are responsible for the accuracy and completeness of the information analyzed.

Funding:

This research was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil; Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

Conflict of interest

Authors declare no conflicts of interest.

Resultados. Se encontraron perfiles de resistencia a los antimicrobianos similares en los dos grupos. En todas las bacterias obtenidas de las muestras de agua y en 90 % de las muestras clínicas, se evidenciaron bandas de plásmidos asociados con la transferencia de genes de resistencia. En las pruebas de PCR, se obtuvieron productos de amplificación de los genes de resistencia para las tres clases de antimicrobianos analizados, en el 7,4 % de las bacterias recuperadas de las muestras de agua y en el 20 % de aquellas recuperadas de las muestras clínicas.

Conclusión. La detección de microorganismos con elementos genéticos que confieren resistencia a los antibióticos en ambientes como el agua, es una estrategia necesaria para prevenir y controlar la diseminación de estos agentes patógenos con potencial para infectar a humanos y a otros animales en dichos ambientes.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*; *Escherichia coli*; resistencia a múltiples medicamentos; plásmidos; aguas residuales; Brasil.

It is well known that the use of broad-spectrum antibiotics such as aminoglycosides, third- and fourth-generation cephalosporins, and fluoroquinolones allows selecting opportunistic multidrug-resistant bacteria which can colonize inpatients and, in some cases, cause serious infection difficult to treat (1,2). As in many warm-blooded animals, human intestine is known to harbor bacteria capable of causing infections in hospitals and in the community (3,4).

In the natural environment, the selection of multidrug-resistant bacteria may occur due to the production of antibiotic compounds by soil bacteria, but also due to discharges of human and animal feces that may contain antimicrobial drug residues (5,6). Some resistance encoding genes may be chromosomal housekeeping genes involved in the bacterium own protection against the antimicrobial compounds they produce by themselves or by other bacteria in the surrounding environment (6,7).

Additionally, some antimicrobial drugs are still used in animal farms and aquaculture as growth promoters and as prophylactic agents, which can also cause an artificial selection of antimicrobial-resistant bacteria (8-10). The use of antimicrobial drugs in humans, animal husbandry and veterinary care may enable the selection of bacterial strains with potential resistance traits resulting in host colonization and infection by different bacteria, such as those belonging to the Enterobacteriaceae family. This event may result in the appearance of bacteria with different resistance profiles which challenge treatment (11,12).

Another major concern is the existence of mobile genetic elements in some bacteria such as plasmids, gene cassettes, and transposons that can assemble blocks of resistant genes and transfer them horizontally enabling other bacteria to acquire genes encoding for resistance mechanisms to several antimicrobial drugs (13-15).

The ecosystem of several bodies of water has been seriously compromised by human practices and lifestyle. The discharges of households, hospitals and industrial residues without previous appropriate treatment have added to the problematic of bacterial antimicrobial resistance dissemination throughout these environments, which are used by humans and animals in many ways: for sports, professionally or for survival, users who may become colonized or infected by resistant bacteria (16-18).

Guanabara Bay is the second largest bay in Brazil (with 380 km²); it runs all along Rio de Janeiro urban cost line and has suffered intense degradation for many years due to population growth and industry development (19). Among the consequences of the degradation suffered by the accumulation of waste and sewage in these areas, we can mention the floods during heavy rain periods and the diseases caused by various microorganisms they brought with them.

In a previous study, Meirelles-Pereira, *et al.*, detected the presence of strains of multidrug-resistant bacteria in sewage samples from a hospital in Rio de Janeiro, as well as from coastal lagoons in the city (20). The presence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and enzymes modifying aminoglycosides (EMA) was confirmed by phenotypic and PCR assays (data not shown).

The purpose of this work was to identify specific genes encoding EMA, ESBL, and plasmid mechanisms of quinolone resistance (PMQR) in *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* strains, which were isolated from Guanabara Bay water samples and hospital waste to better understand the dissemination of resistant mobile genetic elements in the natural environment and in hospital settings.

Materials and methods

Study area

The Guapimirim River, which is part of the Magé Channel, supplies the municipalities of São Gonçalo and Niterói and is located on the northern coast of the hydrographic region of the Guanabara Bay where the best preserved rivers are located (19).

The Guaxindiba River, located on the eastern coast, is born in São Gonçalo and it traverses part of the largest preserved mangrove area of the Guanabara Bay (the Guapimirim Environmental Protection Area) before discharging into the bay in its lower section. Large masses of sewage and other waste produced by the population inhabiting its surroundings are deposited in its waters through tributaries contributing to the degradation of the mangroves.

The Caceribu River is one of the main contributors to the Guanabara Bay. With almost 60 km of extension, its springs originate in the mountains of Rio Bonito and Tanguá municipalities and flow on the eastern slope of the Guanabara Bay through the Guapimirim mangrove (19).

The Mangue Channel on the western coast and its tributaries run through the most densely populated areas and they receive large quantities of treated and untreated sewage and residues including antimicrobials from industries and surrounding residential areas. The waters in the region comprising the Channel between Governor and Fundão Islands and the mainland have the worst quality, with high concentrations of nutrients such as phosphorus and nitrogen, as well as fecal coliforms, and a low concentration of oxygen due to the releases of raw or partially treated effluents from industrial and residential areas located north of Rio de Janeiro (19).

Strain selection

We studied 37 strains: 26 of *E. coli*, nine of *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, and two of *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*. These strains were isolated from water collected in rivers that flow into the Guanabara Bay and from clinical specimens collected at a university hospital in Rio de Janeiro.

Environmental samples were collected at Guapimirim, Caceribu, and Guaxindiba Rivers and in the Magé Channel (Guapimirim Environmental Protected Area - Magé, RJ) in April, 2009 (figure 1). We also collected samples from two different areas of the Fundão Island rivers, from Bica beach (Governador Island), and the Mangue Channel in July, 2009. Regarding

clinical samples, the criterion for selection was growth in selective media. Residues of hospital origin containing antimicrobials and microorganisms are continuously released into aquatic receptacles contaminating the environment and favoring the dissemination of transferable resistance markers between the microorganisms.

Isolation of strains from clinical material

Strains of *K. pneumoniae* and *E. coli* from different clinical materials collected and analyzed in the bacteriology laboratory of the university hospital between May and July, 2010, were inoculated in eosin methylene blue agar (EMB) (Oxoid) containing 8 µg/mL of gentamicin (Sigma) and those with positive growth were selected for the study.

Isolation of strains from water samples

Sterile flasks were used to collect the water samples, which were then transported on ice to the laboratory in the next six hours and tested straight after arrival according to the Environmental Protection Agency (EPA) protocols (21). A selection criteria was resistance to gentamicin as for the clinical samples, but also resistance to cephalotin, the latter determined by adding 32 µg/mL of cephalotin (Sigma) into the EMB media. The collection was done during low tide to determine the effect of higher hydrolytic pressure in the drained areas under study. The strains with macroscopic characteristics compatible with the bacterial species of interest were identified according to Winn, *et al.* (22).

Antimicrobial susceptibility tests

The antimicrobial susceptibility tests (AST) was carried out using the agar diffusion method according to the Clinical Laboratories Standards Institute (CLSI) (23). *Escherichia coli* strain ATCC 25922 was used as control.

The following antimicrobial agents (Oxoid) were used with their respective potencies: Cotrimoxazol (Sut- 25 µg), cephalotin (Cph- 30 µg), ceftazidime (Caz- 30 µg), cefoxitin (Fox- 30 µg), cefotaxime (Ctx- 30 µg), cefuroxime (Crx- 30 µg), ceftriaxone (Cro- 30 µg), cephazoline (Cfz- 30 µg), aztreonam (Atm- 30 µg), ertapenem (Etp- 10 µg), imipenem (Ipm- 10 µg), cefepime (Cpm- 30 µg), piperacillin/tazobactam (Ppt- 100/10 µg), amoxicillin/clavulanic acid (Amc- 20/10 µg), ampicillin/sulbactam (Asb- 10/10 µg), chloramphenicol (Chl- 30 µg), ciprofloxacin (Cip- 5 µg), norfloxacin (Nor- 10 µg), tetracycline (Tet- 30 µg), ampicillin (Amp- 10 µg), gentamicin (Gen- 10 µg), amikacin (Ak- 30 µg), kanamycin (Kan- 30 µg), tobramycin (Tob- 10 µg).

Phenotypic detection of ESBL

The isolates resistant to second and third cephalosporin's generation in AST were submitted to confirmatory tests of ESBL production by the double-disc synergy test and the approximation test following the CLSI standards (24). *Klebsiella pneumoniae* strain ATCC 700603 was used as the test control.

Plasmid extraction

Plasmid DNA alkaline extraction was performed on all strains following Gonçalves, *et al.* (25). The strains were subjected to electrophoresis in 0.8% agarose gel (Sigma) for plasmid detection. We used the *E. coli* R861 strain plasmid DNA as weight marker and the *E. coli* K12 R23 as the negative control.

Gene detection by PCR

PCR was performed using primers compatible with ESBL, EMA, and PMQR in all *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, and *E. coli* strains resistant to any antimicrobial drug tested in the AST following the work developed by Arlet, *et al.* (26), Pitout, *et al.* (27), van de Klundert, *et al.* (28), and Jiang, *et al.* (29).

Isolates showing resistance to carbapenems were sent to the Healthcare Associated Infections Laboratory (LAPIH) of the Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz) for the identification of the *bla*_{KPC} gene according to Yigit, *et al.* (30).

The thermal cycling conditions were performed in a Cetus model 480 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT).

PCR assays were performed in a 25 µl total volume adding the following components to the reaction tubes: 1 µl of target DNA (obtained from dilutions of colonies in 50 µl of 10 mM Tris, 1 mM EDTA - pH 8.0 (Sigma), 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0,2 mM of dNTP mixture (dATP, dTTP, dCTP and dGTP) (Invitrogen), 20 pmol of each primer (Invitrogen), 1x PCR buffer (Promega), and 1.25 U of Taq DNA Polymerase (Invitrogen).

The amplified products were subjected to electrophoresis in a 1.5% agarose gel (Sigma). Table 1 shows all primers used in the PCR reactions and the expected amplicon sizes.

Table 1. Primers used on the PCR assays for EMA, ESBL, and PMQR encoding genes detection

Primer	Sequence 5' 3' →	Amplicon size	Reference
Acc3IIa-F	ACT GTG ATG GGA TAC CGC TC	237 bp	(28)
Acc3IIa-R	CTC CGT CAG CGT TTC AGC TA		
TEM-F	TTG GGT GCA CGA GTG GGT TA	503 bp	(26)
TEM-R	TAA TTG TTG CCG GGA AGC TA		
SHV-F	TCG GGC CGC GTA GGC ATG AT	625 bp	(26)
SHV-R	AGC AGG GCG ACA ATC CCG CG		
CTX-M-1-F3	GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC	499 bp	(27)
CTX-M-1-R2	AGC CGC CGA CGC TAA TAC A		
TOHO-1-2F	GCG ACC TGG TTA ACT ACA ATC C	351 bp	(27)
TOHO-1-1R	CGG TAG TAT TGT CCT TAA GCC		
qnrA up	AAG GAA GCC GTA TGG ATA TT	670 bp	(29)
qnrA dw	AGC TAA TCC GGC AGC ACT AT		
qnrB up	CGA CCT GAG CGG CAC TGA AT	515 bp	(29)
qnrB dw	TGA GCA ACG ATG CCT GGT AG		
qnrS up	ACC TTC ACC GCT TGC ACA TT	509 bp	(29)
qnrS dw	CCA GTG CTT CGA GAA TCA GT		
KPC-F	TGT CAC TGT ATC GCC GTC	1011 bp	(30)
KPC-R	CTC AGT GCT CTA CAG AAA AAC C		

Results

Strain isolation from clinical material

We isolated five strains of *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* and five strains of *E. coli* from the EMB media containing gentamicin.

Strain isolation from water samples

We isolated 17 *E. coli*, four *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, and one *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* from the media containing gentamicin

and four *E. coli* and one *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* from the media containing cephalotin.

Antimicrobial susceptibility testing and ESBL confirmation test

To determine the resistance profiles of all isolated strains we used different classes of antimicrobial drugs ranging from those first used in therapeutics to the latest introduced in the medical practice.

There were some differences between strains isolated from media supplemented with gentamicin and those isolated from media supplemented with cephalotin in the water samples. Of the isolates obtained from gentamicin media, eight (36.4%) were resistant to cephalotin on the AST and of those obtained from cephalotin media, two (40%) were resistant to gentamicin on the AST. In water isolates, ten (37%) showed multidrug-resistance profiles similar to those displayed by clinical isolates, i.e., they were resistant to drugs used specifically in healthcare settings.

Twelve isolates were tested to confirm the presence of ESBL enzymes and 11 (91.7%) of them were positive. Fourteen (51.8%) showed resistance to ciprofloxacin and norfloxacin, four (14.8%) to amikacin, and one from Caceribu River and one from the Mage Channel were resistant to cefepime, a fourth generation cephalosporin usually used exclusively in hospitals. Furthermore, four isolates from Bica beach, one from the Mangue channel, and two from Fundão Island II were all resistant to cefepime. One *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* isolate, also from Fundão Island II, was resistant to ertapenem.

Table 2 presents information regarding water isolates, such as the collection site, the most relevant environmental parameters, and the antimicrobial resistance profile.

Regarding the clinical isolates, eight (80%) showed a multidrug-resistant profile typical in hospital settings. All ten isolates were resistant to amikacin, five (50%) were sensitive to chloramphenicol, six (60%) exhibited resistance to ciprofloxacin and norfloxacin, and four (40%) isolates were resistant to cefepime. Additionally, three (30%) isolates showed resistance to imipenem and ertapenem, which may indicate carbapenemases production, and five (50%) indicated ESBL production.

Table 3 shows information regarding clinical isolates, such as the sample type, the hospital ward, and the antimicrobial resistance profile.

Plasmid DNA extraction

All strains isolated from water and nine (90%) strains isolated from clinical samples had at least one plasmid band.

Polymerase chain reaction (PCR)

Of all the water isolates collected at the Guanabara Bay, nine (37.5%) showed PCR amplicon specific to EMA, two (18.2%) only for ESBL, and one (16.6%) for PMQRs. Seven (63.3%) isolates had positive amplification for both EMA and ESBL encoding genes. Two (7.4%) showed the presence of EMA, ESBL, and PMQR encoding genes (table 4).

Of the clinical isolates, two (20%) showed gene amplification for EMA and only one (20%) for ESBL. Three (60%) isolates presented an amplicon for

both EMA and ESBL; one (16%) for ESBL and PMQR, and two (20%) had PCR positive results for all EMA, ESBL, and PMQR encoding genes (table 5).

Discussion

The number of bacterial strains resistant to antimicrobial drugs has been increasing considerably in the natural environment due to the vast use of these drugs in hospitals and in the community, as well as in animal husbandry and veterinary care. The problem has increased due to hospital sewage dumping in natural environments, particularly in bodies of water, which facilitates the dissemination of bacterial strains harboring resistant and virulent mechanisms throughout them and may contribute to an outbreak of massive proportions, as well as the dissemination of mobile genetic elements carrying resistant genes and concomitant virulent genes.

Water sample collection was performed in two different areas of the Guanabara Bay which are substantially distinct from each other as regards

Table 2. Enterobacteriaceae isolated from water on the different collection sites at the Guanabara Bay including their resistance profiles

Collection site	Phosphorus ($\mu\text{M/L}$)	Strain	Resistance profiles	Confirmatory test for ESBL
Guapimirim River	2,4	Ec 1Gb	Cph/Amp/Cip/Nor/Tet/Gen/Tob	NT
		Ec 1Ge	Amp/Gen/Kan	NT
		Ec 1Gf	Tet/Gen/Ami	NT
		Ec 1Cfld	Cfl/Cfz/Cro/Ctx/Amp/Cip/Nor/Tet/Amc/Sut	(-)
		Kp 1Gd	Amp/Cip/Nor/Tet/Chl/Gen/Kan/Tob	NT
Caceribu River	8,6	Ec 2Ga1	Amp/Gen/Kan/Tob	NT
		Ec 2Ga2	Amp/Gen/Ak	NT
		Ec 2Gc	Amp/Cip/Nor/Gen	NT
		Ec 2CFLd	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Amp	(+)
		Kp 2Ge	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Cpm/Atm/Amp/Cip/Nor/ Tet/Gen/Amc/Sut	(+)
		Kp 2Gf	Amp/Tet/Gen	NT
Guaxindiba River	3,2	Ec 4Ga1	Tet/Gen	NT
		Ec 4Ge	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Caz/Cpm/Atm/Amp/Cip/ Nor/Tet/Chl/Gen/ Kan/Tob/Ppt/Amc/Sut	(+)
Fundão Island I	13,2	Ec 5Ga	Amp/Tet/Gen/Kan	NT
		Ec 5Gd	Amp/Cip/Nor/Tet/Gen/Kan	NT
Fundão Island II	49,7	Ec 6Ga	Amp/Cip/Nor/Tet/Chl/Gen	NT
		Ko 6Gb	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Caz/Cpm/Atm/Amp/Cip/ Nor/Tet/Gen/ Kan/Tob/Amc/Sut	(+)
		Ko 6CFL	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Caz/Cpm/Atm/lpm/Etp/ Amp/Cip/Nor/Tet/Gen/Kan/Tob/Ppt/Amc/Asb/ Sut	(+)
Bica beach	19,5	Ec 7Ga	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Cpm/Amp/Cip/Nor/Tet/ Chl/Gen/Tob/Amc/Sut	(+)
		Ec 7Gb	Cph/Cfz/Cro/Crx/Cpm/Atm/Amp/Cip/Nor/Tet/ Chl/Gen/Amc/Asb/Sut	(+)
		Ec 7Gc	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Cpm/Atm/Amp/Cip/Nor/ Tet/Chl/Gen/Ami/Amc/Sut	(+)
		Ec 7CFLd	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Cpm/Atm/Amp/Cip/Nor/ Tet/Chl/Gen/Amc/Sut	(+)
Mangue Channel	64,6	Kp 8b1	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Caz/Atm/Amp/Cip/Nor/ Tet/Gen/Kan/Tob	(+)

Ec: *E. coli*; Kp- *K. pneumoniae*; Ko: *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*; Cph: Cephalotin; Cfz: Cephazolin; Cro: Ceftriaxone; Crx: Cefuroxime; Ctx: Cefotaxime; Caz: Ceftazidime; Cpm: Cefepime; Atm: Aztreonam; lpm: Imipenem; Etp: Ertapenem; Amp: Ampicillin; Cip: Ciprofloxacin; Nor: Norfloxacin; Tet: Tetracycline; Chl: Chloramphenicol; Gen: Gentamicin; Ak: Amikacin; Kan: Kanamycin; Tob: Tobramycin; Ppt: Piperacillin/tazobactam; Amc: Amoxicillin/clavulanic acid; Asb: Ampicillin/sulbactam; Sut: Cotrimoxazol; NT: not tested

Table 3. Enterobacteriaceae isolated from clinical samples including their resistance profiles

Unit	Sample	Strain	Resistance profiles	Confirmatory test for ESBL
Ambulatory	Urine	Ec 1407	Amp/Cip/Nor/Tet/Gen/Tob/Sut	NT
		EC 1419	Cfl/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Nor/Tet/ Clo/Gen	(-)
		Ec 1798	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Caz/Cpm/Atm/Amp/Tet/Chl/Gen/Kan/Tob/Asb/Sut	(+)
		Ec 2383	Amp/Cip/Nor/Tet/Gen/Sut	NT
Thoracic surgery clinic	Pleural fluid	Ec 1633a	Cph/Cfz/Crx/Caz/Amp/Cip/Nor/Chl/Gen/Kan/Tob/Asb/Sut	(+)
ICU	Secretion	Kp 2141b	Cph/Cfz/Cro/Fox/Crx/Caz/Atm/Ipm/Etp/Amp/Gen/Kan	(+)
MC unit	Blood	Kp 2492	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Amp/Tet/Gen/Sut	(+)
IPD unit	Urine	Kp 2692	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Cpm/Amp/Cip/Nor/Tet/ Gen/Kan/Tob/Sut	(+)
Nephrology	Peritoneal fluid	Kp 7438	Cph/Cfz/Cro/Crx/Ctx/Cpm/Atm/Imp/Etp/AMP/ Atm/Imp/Etp/Amp/Cip/Nor/ Tet/Chl/Gen/Tob/Ppt/Asb/Sut	(-)
	End portion of Tenckhoff catheter	Kp 7474	Cph/Cfz/Cro/Fox/Crx/Ctx/Cpm/Atm/Imp/Etp/Amp/Cip/Nor/Tet/Chl/Gen/ Tob/Ppt/Asb/Sut	(-)

Ec: *E. coli*; Kp: *K. pneumoniae*; ICU: Intensive care unit; MC: Medical clinic unit; IPD: unit of infectious-parasitic diseases; Cph: Cephalotin; Cfz: Cephazolin; Cro: ceftriaxone; Fox: Cefoxitin; Crx: Cefuroxime; Ctx: Cefotaxime; Caz: Ceftazidime; com: Cefepime; Atm: Aztreonam; Ipm: Imipenem; Etp: Ertapenem; Amp: Ampicillin; Cip: Ciprofloxacin; Nor: Norfloxacin; Tet: Tetracycline; Chl: Chloramphenicol; Gen: Gentamicin; Ak: Amikacin; Kan: Kanamycin; Tob: Tobramycin; Ppt: Piperacillin/tazobactam; Amc: Amoxicillin/clavulanic acid; Asb: Ampicillin/sulbactam; Sut: Cotrimoxazol; NT: not tested

Table 4. Genes found by PCR in the Enterobacteriaceae strains isolated from water samples

Strain	Identified genes
Ec 1Gb	<i>aacC2</i>
Ec 1Ge	<i>aacC2</i>
Kp 1Gd	<i>qnrB</i>
Ec 2Ga1	<i>aacC2</i>
Ec 2Ga2	<i>aacC2</i>
Ec 2Gc	<i>aacC2</i>
Ec 2CFLd	<i>blaTOHO-1</i>
Kp 2Ge	<i>aacC2/blaTEM/blaSHV/blaCTX-M-1</i>
Kp 2Gf	<i>aacC2</i>
Ec 3CFLc	<i>blaTOHO-1</i>
Ec 4Ge	<i>aacC2/blaTEM/blaCTX-M-1/qnrB</i>
Ec 5Ga	<i>aacC2</i>
Ec 5Gd	<i>aacC2</i>
Ec 6Ga	<i>aacC2</i>
Ko 6Gb	<i>aacC2/blaTEM/blaSHV/blaCTX-M-1</i>
Ko 6CFL	<i>aacC2/blaTEM/blaSHV/blaCTX-M-1</i>
Ec 7Ga	<i>aacC2/blaTEM/blaCTX-M-1</i>
Ec 7Gb	<i>aacC2/blaTEM/blaCTX-M-1</i>
Ec 7Gc	<i>aacC2/blaTEM/blaCTX-M-1</i>
Ec 7CFLd	<i>aacC2/blaTEM/blaCTX-M-1</i>
Kp 8b ¹	<i>aacC2/blaTEM/blaCTX-M-1/qnrB</i>

Ec: *E. coli*; Kp: *K. pneumoniae*; Ko: *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*

their ecology and preservation practices and legislation. In the protected area of Guapimirim, the quality of water is supposed to be good for human consumption and recreation and the mangrove should be well preserved. Differently, the Fundão and Governador Islands are known to be strongly affected by massive discharges of treated and untreated human and animal sewage due to the vast population living in their surroundings.

Table 5. Genes found by PCR in the Enterobacteriaceae strains isolated from clinical samples

Strain	Identified genes
Ec 1407	<i>aacC2</i>
Ec 1798	<i>aacC2/ blaTEM/blaCTX-M-1</i>
Ec 2383	<i>aacC2</i>
Ec 1633a	<i>blaTEM/ blaTOHO-1/ qnrA</i>
Kp 2141b	<i>blaTOHO-1</i>
Kp 2492	<i>aacC2/ blaTEM/ blaCTX-M-1/ blaTOHO-1</i>
Kp 2692	<i>aacC2/ blaTEM/blaSHV/ blaCTX-M-1</i>
Kp 7438	<i>aacC2/ qnrB/ blaKPC</i>
Kp 7474	<i>aacC2/ qnrB/ blaKPC</i>

Ec: *E. coli*; Kp: *K. pneumoniae*

No differences were noticed between the resistance profiles in the isolates from the Guapimirim area, Fundão and Governador Islands, and the Mangue Channel, although Guapimirim isolates showed less diverse resistance profiles in the different antimicrobial classes. In all the collection sites within the Guapimirim area, there was at least one isolate showing a resistance profile compatible with hospital strains which are known to be exposed to stronger antimicrobial drugs.

According to Negreiros, *et al.* (31), population growth and industry development, including pharmaceutical industries, affecting these bodies of water have contributed to their degradation. The authors also state that there is a massive agricultural activity in the vicinities of these bodies of water. Besides its privileged geographical location, these areas have been affected by the lack of sewage treatment infrastructures and policies unable to fulfill the demand of population growth. The majority of multidrug-resistant strains were, as expected, isolated in the areas with higher human impact.

It is not possible to discard that bacteria with resistant genes enclosed in plasmids may be disseminated to the bodies of water and that humans might be colonized with these strains when they use the water for consumption, recreational or professional reasons (32,33). Prado, *et al.* (34), demonstrated the presence of *K. pneumoniae* multidrug-resistant strains in water samples collected from hospital sewage treatment facilities. They found that almost 50% of the isolates were positive for beta-lactamic enzyme production and, within this group, 70% were resistant to gentamycin and 10% to ciprofloxacin. In the present study, 80% of the water isolates were positive for *E. coli* and of these, 52% was collected in the Guapimirim protected area and, besides, some multidrug-resistant isolates were found, which may indicate that these areas are being subjected to untreated dumping.

Regarding the clinical isolates, the use of selective agar media supplemented with gentamycin did not allow for the isolation of an enormous amount of isolates, although a high percentage of multidrug resistance was observed. According to Magiorakos, *et al.* (35), resistance to gentamycin may indicate a multidrug-resistant profile.

The water isolates from all the sites exhibited plasmids with different weights, even those strains with intrinsic resistance which were not submitted to antimicrobial pressure. Likewise, clinical isolates presented plasmids with different weights. Vaydia's (14) study on *E. coli* and *K. pneumoniae* of clinical origin containing plasmids and showing resistance to beta-lactamic and other antimicrobials identified by conjugation the transference of genes encoding those traits.

In this study, we detected by PCR the presence of genes encoding resistance to the antimicrobial groups proposed for analysis. The water isolates Ec 4Ge and Kp 8Gb₁, collected at Mage and Mangue Channels showed genes encoding for resistance to the three groups of antimicrobial drugs, as well as the isolates Kp 7438 and Kp7474 collected from peritoneal fluid and the exit site of Tenckhoff catheter, respectively.

Previous studies have described the existence of Enterobacteriaceae strains isolated from food, water, and clinical specimens associated to human infections, which harbor genes encoding resistance to different antimicrobial classes, as well as genes encoding for the same antimicrobial class. Ryu, *et al.* (36), reported on the presence of integrons containing genes which encode resistance to ESBLs, EMAs, and tetracycline in *E. coli* strains isolated from meat fish and seafood in Korea. In clinical specimens in Korea, Shin, *et al.* (2), isolated *E. coli* and *K. pneumoniae* strains resistant to aminoglycosides (including gentamycin) harboring genes encoding for ESBLs and PMQRs associated with integrons enclosed in plasmids transferable by conjugation.

Gene *aacC2* was detected in 58.3% of the water isolates and 70% of the clinical isolates. Gonçalves, *et al.* (37), detected this gene in clinical isolates containing a transposon and insertion sequences (IS), which may indicate that this gene is vastly disseminated in hospital settings, water, soil, and natural environment. Genes found in bacteria isolated from water and animals are similar to those found in pathogenic bacteria isolated from clinical specimens; furthermore, mobile genetic elements, such as integrons and transposons, are certainly involved in their transfer.

All ESBL-positive water isolates in the confirmatory test had at least one ESBL-encoding gene amplified by PCR. Encoding genes for ESBL production are generally the same in isolates from natural environments, animals, and humans. Coque, *et al.* (38), highlighted the need for environmental surveillance to identify bacterial clones capable of producing ESBLs in the community and the natural environment.

Isolate Koz 6CFL from a water sample collected at Fundão Island II and isolate Kp 2141b from a different secretion revealed resistance to fourth-generation cephalosporin and to carbapenems in the AST, but the confirmatory test for carbapenem-enzyme production and PCR for *bla*_{KPC}, were negative. Thus, resistance to imipenem and ertapenem seem to be associated with other resistance mechanisms. In the strains expressing resistance to fourth generation cephalosporin's and carbapenems in the AST, we chose to evaluate only the presence of *bla*_{KPC} gene and not other genes like *bla*_{OXA}, *bla*_{IMP} and *bla*_{NDM}. The *bla*_{KPC} gene was initially detected in strains of *K. pneumoniae* of hospital origin, which aroused our interest to investigate the presence of this gene in environmental strains and to compare them with strains isolated from clinical samples.

Leavitt, *et al.* (39) identified *K. pneumoniae* strains resistant to ertapenem which were not carbapenemases producers but instead harbored genes for CTX-M, SHV, and TEM associated with changes in the cell wall permeability due to a lack of gene expression for cell-wall membrane proteins. In the present study, isolate Koz 6CFL showed the presence of genes encoding for CTX-M, SHV, and TEM while isolate Kp 2141b only presented genes encoding for CTX-M. The existence of these encoding genes in clinical isolates would have serious consequences for antibiotic therapy, and their

presence in environmental isolates may indicate not-treated discharges into the natural environment which may contain antimicrobial drug residues and/or bacteria carrying resistance genes in mobile genetic elements.

Strains Ec 1Gd, Ec 4Ge, and Kp 8Gb₁ isolated from the Guapimirim and Magé Rivers and from Mangue Channel, respectively, showed PCR results positive for *qnrB* gene. Takasu, *et al.* (40), detected the presence of *qnrB* in isolates from samples collected in bodies of water in Vietnam and concluded that the presence of this gene in such isolates was not associated with the use of quinolone antimicrobials in animal husbandry, aquaculture or infections control, although the existence of these genes *in natura* has not been proven to be intrinsic to the bacterial genome. According to Strahilevitz, *et al.* (41), the origins of *qnr* family genes were not only found in environmental bacteria but also in bacteria isolated from humans and animals. Nordmann, *et al.* (42), reported that *qnr* genes in Enterobacteriaceae can be associated to ESBLs, CTX-M-1 or CTX-M-9, which may indicate that genes encoding for beta-lactamases and quinolone resistance mechanisms may be located in the same plasmid with a possibility of transfer to other species.

The presence in hospital settings of Enterobacteriaceae strains harboring resistance genes to several classes of antimicrobial drugs or of several genes encoding for one same class is a well-established fact (43). Besides the small bacterial population analyzed in the present study, it was possible to detect a representative group with well discernible characteristics, which is occurring in hospitals all over the world. In a study by Minarini, *et al.* (44), Enterobacteriaceae strains harboring *qnr* genes were isolated from outpatients in several Brazilian states. Although the clinical isolates in this study come from inpatients, these results corroborate those reported by Minarini, *et al.* (44), showing that *qnrB* is more prevalent in Brazil than *qnrA*, while in the latter study, no samples from Rio de Janeiro state were studied.

Öktem, *et al.* (45), studying *E. coli* and *K. pneumoniae* strains isolated from blood samples showing resistance to beta-lactamic and quinolone drugs found a correlation between the plasmids containing at least one beta-lactamase encoding gene (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} or *bla*_{CTX-M}) associated with the presence of the *qnrA* gene. All the isolates in the study, except for Kp 2692, showed the presence of a plasmid by PCR testing. The existence of plasmids concomitantly harboring genes encoding resistance for different classes of antimicrobial drugs may promote dissemination of bacteria involved in infections of complex treatment (38).

Sewage treatment plants constitute a favorable environment for the selection and transfer of resistance genes between bacteria. Mokracka, *et al.* (46), studied the water from different sites at a sewage treatment plant and found *E. coli* strains containing integrons, even in samples from the end effluent, some of which even had genes encoding for different antimicrobial classes. In the present study, we found an isolate (Kp 2Ge) from water collected at the Caceribu River containing the *aacC2*, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and the *bla*_{CTX-M-1} genes. There was also an isolate (Ec 4Ge) from water collected at the Magé Channel that included *aacC2*, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, and *qnrB* genes. Despite the fact that the Caceribu River and the Magé Channel are part of a protected area, they have been degraded due to discharges of anthropic origin, results which were corroborated by the data from the *Instituto Estadual de Meio Ambiente* (INEA) (19).

Among the isolates from water samples collected in the areas of higher degradation, isolates Koz 6Gb and Koz 6CFL (from Fundão Island II) contained *aacC2*, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M-1} genes. Isolates Ec 7Ga, Ec

7Gb, Ec 7Gc, and Ec 7CFLd from water samples collected at Bica beach showed the presence of *aacC2*, *bla*_{TEM}, and *bla*_{CTX-M-1} genes, while isolate Kp8Gb from water samples collected at the Mangue Channel harbored the *aacC2*, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, and *qnrB* genes.

The transfer of genetic elements is occurring uninterruptedly in the hospital and the community environments either during bacterial division (vertical form) or through other mechanisms, such as bacterial conjugation (horizontal form). The selective pressure for the use of antimicrobials in these environments chooses those microorganisms that carry such elements, which will thus have the possibility of spreading to other microorganisms.

The presence of *E. coli* strains in water samples is an indicator of fecal contamination (47). Multidrug-resistant Enterobacteriaceae strains which colonize human and animal intestines are continuously discharged to the natural environment and may cause serious opportunistic infections behaving as reservoirs for antimicrobial-resistant genes. The genes identified in the present study indicate that the water bodies where samples were collected were exposed to sewage dumping from households, hospitals, and industries and this has prompted the presence of bacteria with the latter characteristics in these natural bodies of water.

We want to emphasize that the use of adequate procedures such as the proper use of antimicrobial drugs in hospitals, veterinary care, and aquaculture, may contribute to more efficient control of the dissemination of bacteria harboring plasmids containing genes encoding for antimicrobial-resistance mechanisms. It is clear that there is a need for a committed effort to sustain efficient microbiological monitoring and to prevent the discharges of antimicrobial drugs residues and bacteria into the natural environment. It is also paramount to detect multidrug-resistant bacteria in bodies of water given that this is an efficient way of disseminating bacteria and the traits they may carry.

Acknowledgments

We want to thank Fiocruz/LAPIH/IOC/Brazil, especially Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef and Polyana Pereira for performing the KPC PCR, and Dr. Julio César Delgado Correal (Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE/UERJ) for the Spanish version of the abstract.

References

1. Ramphal R, Ambrose PG. Extended-spectrum β -lactamases and clinical outcomes: Current data. *Clin Infect Dis*. 2006;42(Suppl.4):S164-72. <https://doi.org/10.1086/500663>
2. Shin SY, Kwon KC, Park JW, Song JH, Ko YH, Sung JY, *et al.* Characteristics of *aac(6)-Ib-cr* gene in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Chungnam area. *Korean J Lab Med*. 2009;29:541-50. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.6.541>
3. Harada K, Morimoto E, Kataoka Y, Takahashi T. Clonal spread of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates among pups in two kennels. *Acta Vet Scand*. 2011;53:11-7. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-11>
4. Alem N, Frikh M, Srfi A, Maleb A, Chadli M, Sekhsokh Y, *et al.* Evaluation of antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated in Rabat University Hospital (Morocco). *BMC Res Notes*. 2015;8:392-5. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1380-9>
5. Ajiboye RM, Solberg OD, Lee BM, Raphael E, DebRoy C, Riley LW. Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections. *Clin Infect Dis*. 2009;49:365-71. <https://doi.org/10.1086/600301>

6. Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart H-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol.* 2013;4:47. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00047>
7. Martínez JL. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci.* 2009;276:2521-30. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0320>
8. Bonelli RR, Moreira BM, Picão RC. Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. *Drug Resist Updat.* 2014;17:24-36. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2014.02.001>
9. Bok E, Mazurek J, Stosik M, Wojciech M, Baldy-Chudzik K. Prevalence of virulence determinants and antimicrobial resistance among commensal *Escherichia coli* derived from dairy and beef cattle. *Int J Environ Res Public Health.* 2015;12:970-85. <https://doi.org/10.3390/ijerph120100970>
10. Resende JA, Borges ML, Pacheco KD, Ribeiro IH, Cesar DE, Silva VL, *et al.* Antibiotic resistance in potentially bacteriocinogenic probiotic bacteria in aquaculture environments. *Aquac Res.* 2017;48:2113-9. <https://doi.org/10.1111/are.13047>
11. Guenther S, Ewers C, Wieler LH. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wild life, yet another form of environmental pollution? *Front Microbiol.* 2011;2:246. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00246>
12. Jones-Dias D, Manageiro V, Graça R, Sampaio DA, Albuquerque T, Themudo P, *et al.* QnrS1- and Aac(6')-Ib-cr-Producing *Escherichia coli* among isolates from animals of different sources: Susceptibility and genomic characterization. *Front Microbiol.* 2016;7:671. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00671>
13. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilonis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas).* 2011;47:137-46.
14. Vaidya VK. Horizontal transfer of antimicrobial resistance by extended spectrum β lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Lab Physicians.* 2011;3:37-42. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.78563>
15. Lyimo B, Buza J, Subbiah M, Temba S, Kipasika H, Smith W, *et al.* IncF plasmids are commonly carried by antibiotic resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water sources in Northern Tanzania. *Int J Microbiol.* 2016;2016:3103672. <https://doi.org/10.1155/2016/3103672>
16. Ibekwe AM, Murinda SE, Graves AK. Microbiological evaluation of water quality from urban watersheds for domestic water supply improvement. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8:4460-76. <https://doi.org/10.3390/ijerph8124460>
17. Bayram A, Önsoy H, Bulut VN, Akinci G. Influences of urban wastewaters on the stream water quality: A case study from Gumushane Province, Turkey. *Environ Monit Assess.* 2013;185:1285-303. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2632-y>
18. Derrien M, Jardé E, Gruau G, Pourcher AM, Gourmelon M, Jadas-Hécart A, *et al.* Origin of fecal contamination in waters from contrasted areas: Stanols as microbial source tracking markers. *Water Res.* 2012;46:4009-16. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.05.003>
19. Instituto Estadual de Meio Ambiente. A Baía de Guanabara, segunda maior baía do litoral brasileiro, possui uma área de cerca de 380 km², englobando praticamente toda a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. Accessed: February 15, 2018. Available at: <http://www.inea.rj.gov.br/Portal/MegaDropDown/Monitoramento/Qualidadedaagua/Baias/BaiadaGuanabara/index.htm>
20. Meirelles-Pereira F, Meirelles AS, Gomes-da-Silva MC, Gonçalves VD, Brum PR, Castro EA, *et al.* Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. *Braz J Microbiol.* 2002;33:287-93. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000400002>
21. Environment Protection Authority. EPA Guidelines: Regulatory monitoring and testing water and wastewater sampling. Adelaide, SA: EPA; 2007.
22. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Gary P, Srechenberger P, *et al.* Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia, New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
23. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fourth Informational Supplement M100-S24. Wayne, PA: CLSI; 2014.
24. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved Standard CLSI Document M2. Wayne, PA: CLSI; 2010.

25. Gonçalves VD, Provençano AF, Espírito-Santo C, Bernardes O, Queiroz ML, Bello AR, *et al.* Evaluation of different protocols for detection of enterobacterial plasmids codifying for antimicrobial resistance. *Sodebrás*. 2013;8:9-15.
26. Arlet G, Philippon A. Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable beta-lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiol Lett*. 1991;66:19-25.
27. Pitout JDD, Hossain A, Hanson ND. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol*. 2004;42:5715-21. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5715-5721.2004>
28. van de Klundert JAM, Vliengenthart JS. PCR detection of genes coding aminoglycoside-modifying enzymes. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. *Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications*. Rochester: Mayo Foundation; 1993. p. 547-52.
29. Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61:1003-6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn063>
30. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sánchez A, Biddle JW, Steward CD, *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1151-61. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>
31. Negreiros DH, Araújo FP, Coreixas MA. *Nossos Rios*. Niterói: Instituto Baía de Guanabara; 2002. p. 31.
32. Oliveira AJFC, França PTR, Pinto AB. Antimicrobial resistance of heterotrophic marine bacteria isolated from seawater and sands of recreational beaches with different organic pollution levels in southeastern Brazil: Evidences of resistance dissemination. *Environ Monit Assess*. 2010;169:375-84. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-1180-6>
33. Zhao J-y, Dang H. Coastal seawater bacteria harbor a large reservoir of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Jiaozhou Bay, China. *Microb Ecol*. 2012;64:187-99. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0008-z>
34. Prado T, Pereira WC, Silva DM, Seki LM, Carvalho AP, Asensi MD. Detection of extended-spectrum b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett Appl Microbiol*. 2008;46:136-41. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02275.x>
35. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:268-81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
36. Ryu S-H, Park S-G, Choi S-M, Hwang Y-O, Ham H-J, Kim S-U, *et al.* Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. *Int J Food Microbiol*. 2012;152:14-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.003>
37. Gonçalves VD, Lengruher FB, Fonseca BO, Pereira RM, Melo LD, Lopes UG, *et al.* Detection and characterization of multidrug-resistant enterobacteria bearing aminoglycoside-modifying gene in a university hospital at Rio de Janeiro, Brazil, along three decades. *Biomédica*. 2015;35:117-24. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2276>
38. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill*. 2008;13.
Leavitt A, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Goren MG, Ofek I, Navon-Venezia S. Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:3002-6. <https://doi.org/10.1128/AAC.01818-09>
39. Takasu H, Susuki S, Reungsang A, Viet PH. Fluoroquinolone (FQ) contamination does not correlate with occurrence of fq-resistant bacteria in aquatic environments of Vietnam and Thailand. *Microbes Environ*. 2011;26:135-43. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10204>
40. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:664-89. <https://doi.org/10.1128/CMR.00016-09>
41. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56:463-9. <https://doi.org/10.1093/jac/dki245>

42. Jeong HS, Bae IK, Shin JH, Kim SH, Chang CL, Jeong J, *et al.* Fecal colonization of Enterobacteriaceae carrying plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Korea. *Microb Drug Resist.* 2011;17:507-12. <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0040>
43. Minarini LA, Poirel L, Cattoir V, Darini AL, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:474-8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn237>
44. Öktem IM, Gülay Z, Bicmen M, Gür D, Gültekin M, Ögünç D, *et al.* *qnrA* prevalence in extended-spectrum β -lactamase-positive Enterobacteriaceae isolates from Turkey. *Jpn J Infect Dis.* 2008;61:13-7.
45. Mokracka J, Koczura R, Jabłońska L, Kaznowski A. Phylogenetic groups, virulence genes and quinolone resistance of integron-bearing *Escherichia coli* strains isolated from a wastewater treatment plant. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2011;99:817-24. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9555-4>
46. Kolawole OM, Ajayi KT, Olayemi AB, Okoh AI. Assessment of water quality in Asa River (Nigeria) and its indigenous *Clarias gariepinus* fish. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8:4332-52. <https://doi.org/10.3390/ijerph8114332>

Artículo original

Incidencia y subregistro de casos de leptospirosis diagnosticados con tres métodos diferentes en Urabá, Colombia

Janeth Pérez-García¹, Piedad Agudelo-Flórez¹, Gabriel Jaime Parra-Henao¹, Jesús Ernesto Ochoa², Margarita Arboleda³

¹ Grupo de Epidemiología y Bioestadística, Escuela de Graduados, Universidad CES, Medellín, Colombia

² Grupo de Epidemiología, Seminario Taller de Epidemiología Teórica, Facultad Nacional de Salud Pública, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

³ Grupo de Medicina Tropical, Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Apartadó, Colombia

Introducción. La leptospirosis representa un problema de salud pública y es una causa importante de morbimortalidad en la región de Urabá, cuya notificación se ve afectada por las deficiencias en el diagnóstico.

Objetivo. Establecer la incidencia de la leptospirosis en los municipios del llamado 'eje bananero' de la región de Urabá, documentar la magnitud del subregistro y proponer orientaciones para el diagnóstico por laboratorio por parte de la red de salud pública.

Materiales y métodos. Se compararon dos fuentes de información sobre la leptospirosis: el sistema oficial nacional de vigilancia y un estudio transversal de 479 pacientes febriles, llevado a cabo entre abril de 2010 y mayo de 2012. El diagnóstico se hizo con base en tres pruebas: inmunofluorescencia indirecta, microaglutinación y hemocultivo. La exhaustividad de cada fuente de información se estimó mediante el método de captura y recaptura.

Resultados. El 58 % (278/479) de los pacientes fueron positivos para leptospirosis, por lo menos, en una de las pruebas y, el 10,43 % (29/278), en las tres. La inclusión de una cepa nativa en el panel de la prueba de microaglutinación aumentó el porcentaje de positividad en 15 %. La tasa acumulada de incidencia fue de 66,5 por 100.000 habitantes y la proporción de letalidad fue de 2,15 %. El subregistro de la morbilidad por leptospirosis en la región de Urabá, fue de 27,8 % y, el de la mortalidad, de 66,6 %.

Conclusión. El subregistro de leptospirosis en la región reitera la necesidad de usar más de una prueba diagnóstica para identificar *Leptospira* spp. en pacientes de zonas endémicas. Este subregistro podría ser una situación común en todo el país.

Palabras clave: *Leptospira*/diagnóstico; cultivo de sangre; pruebas de aglutinación; técnica del anticuerpo fluorescente indirecta.

Incidencia and underreporting of leptospirosis comparing three diagnostic methods in the endemic region of Urabá, Colombia

Introduction: Leptospirosis represents a public health problem and is a significant cause of morbidity and mortality in the region of Urabá. However, its notification reveals diagnostic limitations.

Objective: To establish the incidence of leptospirosis in the municipalities of the so-called *eje bananero* in the Urabá region, to describe the magnitude of underreporting, and to propose guidelines for laboratory diagnosis by the public health network.

Materials and methods: Two leptospirosis information sources were used: The national official surveillance system and a cross-sectional study of 479 acute-phase patients from April, 2010, to May, 2012. The diagnosis was made using three different tests: Indirect immunofluorescence, microagglutination test, and blood cultures. The exhaustiveness percentage of each information source was calculated using the capture and recapture test.

Results: From the total number of cases, 58% (278/479) were positive for leptospirosis at least by a test and 10.43% (29/278) of cases were positive by all three methods. The inclusion of a native strain in the microagglutination test panel increased the percentage of positivity by 15%. The cumulative incidence rate was 66.5/100,000 inhabitants and the case fatality ratio was 2.15%. The underreporting rates of leptospirosis in the Urabá region were 27.8% in morbidity and 66.6% in mortality.

Conclusion: Under-registration of leptospirosis in the region highlights the necessity to use more than one diagnostic test to identify *Leptospira* in patients from endemic areas. Under-registration could be a common situation throughout the country.

Keywords: *Leptospira*/diagnosis; blood culture; agglutination tests; fluorescent antibody technique; indirect.

Recibido: 20/06/18
Aceptado: 25/10/18
Publicado: 07/11/18

Citación:

Pérez-García J, Agudelo-Flórez P, Parra-Henao GJ, Ochoa JE, Arboleda M. Incidencia y subregistro de casos de leptospirosis diagnosticados con tres métodos diferentes en Urabá, Colombia. Biomédica. 2019;39(Supl.1):150-62
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i0.4577>

Correspondencia

Margarita Arboleda, Carrera 98 N° 106-176, Barrio Chinita, Apartadó, Colombia
Teléfonos: (574) 828 1708 y (574) 828 5606
marboleda@ces.edu.co y margaritarboleda@gmail.com

Contribución de los autores:

Janeth Pérez-García: análisis estadístico e interpretación de los datos
Piedad Agudelo-Flórez y Margarita Arboleda: concepción del estudio, obtención de la financiación y recolección de los datos
Gabriel Jaime Parra-Henao: concepción del estudio y revisión crítica
Jesús Ernesto Ochoa: concepción del estudio e interpretación de los datos
Todos los autores participaron en la redacción del manuscrito.

Financiación:

Proyecto financiado por Colciencias (código 122865740423) como parte del proyecto marco con código 325649326207-678.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

La leptospirosis es una zoonosis bacteriana desatendida (1). El 73 % de los reportes se originan en el trópico y, en Latinoamérica, se registran entre 2.400 y 36.000 casos, en tanto que los casos fatales llegan a los 1.600 (2), por lo que se lo reconoce como el agente patógeno humano más frecuente causante de epidemias (3). La transmisión de *Leptospira* spp. y la expresión clínica de la enfermedad, se relacionan con las condiciones del entorno ambiental y socioeconómico, así como con el desplazamiento rural, la ruptura de las barreras ecológicas naturales y la poca disponibilidad de recursos sanitarios en las zonas rurales y urbanas; asimismo, el cambio climático, las inundaciones y el contacto frecuente entre el humano y sus múltiples reservorios naturales, favorecen el incremento de la incidencia (4,5)

En Colombia, se ha reportado una incidencia de 10,2 casos por 100.000 habitantes (6-9). Su inclusión como una de las zoonosis de notificación obligatoria en el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) data del 2007 (10,11). En el 2015, se reportaron 634 casos confirmados por laboratorio en todo el país, de los cuales 167 (26,1 %) procedían del departamento de Antioquia y, de estos, el 47,3 % (79/167) se registró en la región del Urabá antioqueño (12), la cual comprende 11 municipios (figura 1).

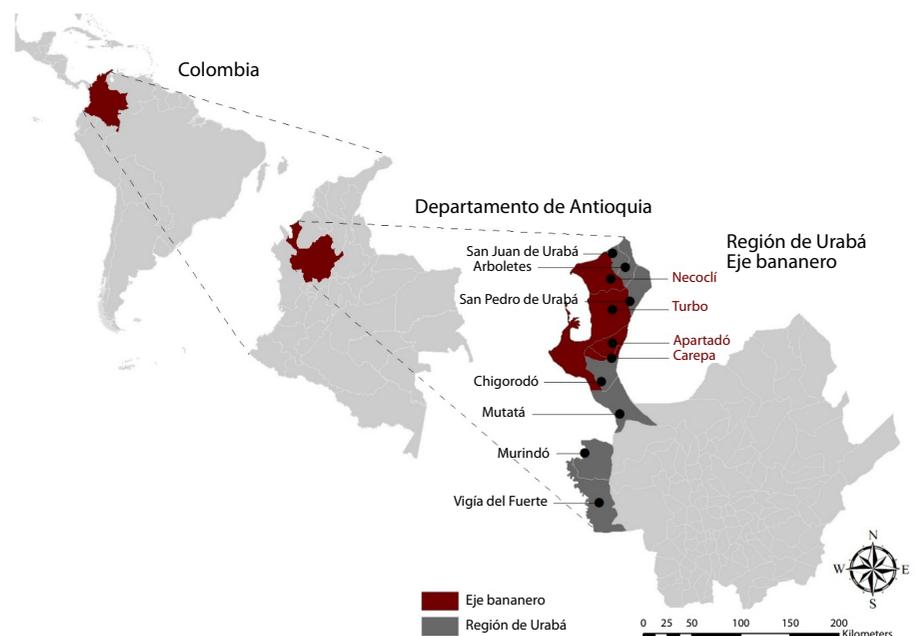


Figura 1. Área geográfica de estudio: región de Urabá, Antioquia, Colombia. Se resaltan en rojo los municipios del eje bananero (Chigorodó, Carepa, Apartadó y Turbo).

La región de Urabá es endémica para varias enfermedades tropicales que cursan como síndromes febriles agudos, algunos de ellos con manifestaciones hemorrágicas (9), como dengue, chikungunya, Zika, leptospirosis, rickettsiosis y malaria, cuyo diagnóstico por el laboratorio en los primeros niveles de atención solo está disponible para algunas de ellas (malaria y dengue), o para pacientes con sintomatología grave o de alerta (13).

La microaglutinación es la prueba de referencia para el diagnóstico de leptospirosis, aunque también pueden emplearse otros métodos, como la prueba ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), la inmunofluorescencia indirecta, las pruebas comerciales rápidas, los hemocultivos y los urocultivos

en medios de cultivo comerciales. Varios autores recomiendan realizar dos pruebas diferentes (14,15), y pruebas moleculares estandarizadas para el diagnóstico rutinario en las áreas endémicas (16).

El subregistro de la incidencia de la leptospirosis y de otras enfermedades febriles, tiene repercusiones a nivel local y nacional para el sistema de vigilancia epidemiológica, así como consecuencias económicas debidas a la hospitalización y a los días de incapacidad de los afectados. Se considera que el uso de las pruebas diagnósticas eficientes puede generar información que permita mejorar los criterios de evaluación de la vigilancia de la leptospirosis, especialmente, en los indicadores de diagnóstico y de tratamiento oportuno.

El objetivo del presente estudio fue establecer la incidencia de leptospirosis en cuatro municipios (Chigorodó, Carepa, Apartadó y Turbo) de los once del llamado 'eje bananero' de la región de Urabá, documentar las deficiencias en la notificación y proponer orientaciones para el diagnóstico por laboratorio en la red de salud pública.

Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio transversal anidado en un proyecto de investigación sobre los factores epidemiológicos asociados con la gravedad de la leptospirosis en la región de Urabá. Se incluyeron 479 pacientes con síndrome febril agudo en cuatro municipios de la región, entre abril del 2010 y mayo del 2012. El diagnóstico se hizo mediante la detección de anticuerpos IgG e IgM en pruebas pareadas con inmunofluorescencia indirecta, técnica estandarizada en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical, ICMT (15), microaglutinación y aislamiento de *Leptospira* spp. a partir del hemocultivo en medio de Fletcher y de Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris.

En la prueba de microaglutinación, se consideró positivo un título de 1:200 y se tuvieron en cuenta, además, los pacientes con seroconversión en la fase convaleciente. El panel serológico incluyó 12 serogrupos de cinco especies de referencia de *Leptospira* patógena y una cepa local: *L. interrogans* serogrupos Icterohaemorrhagiae, Canicola, Sejroe, Pomona y Australis; *L. noguchii* serogrupo Panama; *L. kirschneri* serogrupos Cynopteri y Grippotyphosa; *L. borgpetersenii* serogrupos Ballum y Tarassovi, y *L. santarosai* serogrupos Shermani y Autumnalis (cepa nativa aislada en el municipio de Apartadó). Hubo muestras en las que se evidenció la aglutinación con más de un serogrupo de *Leptospira* (17).

Se construyeron los canales endémicos de leptospirosis para el departamento de Antioquia, para la región de Urabá y para el eje bananero utilizando los casos diagnosticados por detección de anticuerpos IgM mediante ELISA reportados al Sivigila entre el 2008 y el 2015 (18).

Se obtuvieron medidas de frecuencia y se hizo la prueba de ji al cuadrado para determinar la relación entre las variables sociodemográficas y la positividad para leptospirosis; además, se calculó la diferencia de proporciones para la comparación de los resultados de las pruebas diagnósticas que incluyeron la cepa local en la microaglutinación.

Estos análisis se hicieron con el programa SPSS 21.0™ (IBM, Armonk, NY) (bajo licencia de la Universidad CES), teniendo en cuenta un nivel de confianza del 95 % y valores de p menores de 0,05 para evaluar la significación estadística.

Las proporciones de subregistro se calcularon según la ecuación:

$$\text{Subregistro} = 100 - \left(\frac{\text{Casos registrados por el Sivigila}}{\text{Total de casos incluidos en el estudio}} \right) \times 100$$

Los pacientes en el estudio se captaron mediante vigilancia activa y aquellos registrados en el sistema oficial (Sivigila) se habían captado en la vigilancia pasiva a partir de los reportes de las entidades de salud de cada municipio del eje bananero.

Las tasas de incidencia por municipio y por grupo de edad se ajustaron directamente. El subregistro se cuantificó mediante el método de captura y recaptura (19), haciendo uso de los casos registrados en el Sivigila y los detectados en el estudio. Los dos procedimientos se hicieron con el programa Epidat 3.1 (Dirección Xeral de Saúde Pública, Xunta de Galicia, España).

Resultados

Durante el período de estudio, se captaron 479 pacientes con síndrome febril agudo en los cuatro municipios del eje bananero y se confirmó el diagnóstico de leptospirosis en el 58 % (278/479) de los casos.

En la figura 2, se presenta el porcentaje de positividad según el método utilizado. Se observó que, con la prueba de inmunofluorescencia indirecta, hubo una mayor frecuencia diagnóstica (65,1 %) (181/278) y que el 10,43 % (29/278) de los casos fue positivo con los tres métodos.

La inclusión de *Leptospira santarosai* serogrupo Autumnalis cepa JET (cepa nativa) en el panel de serogrupos de la microaglutinación, aumentó en 15 % el porcentaje de positividad con respecto al panel convencional ($p=0,012$).

Los serogrupos con mayor proporción de positividad en la prueba de microaglutinación fueron *Leptospira santarosai* serogrupo Autumnalis

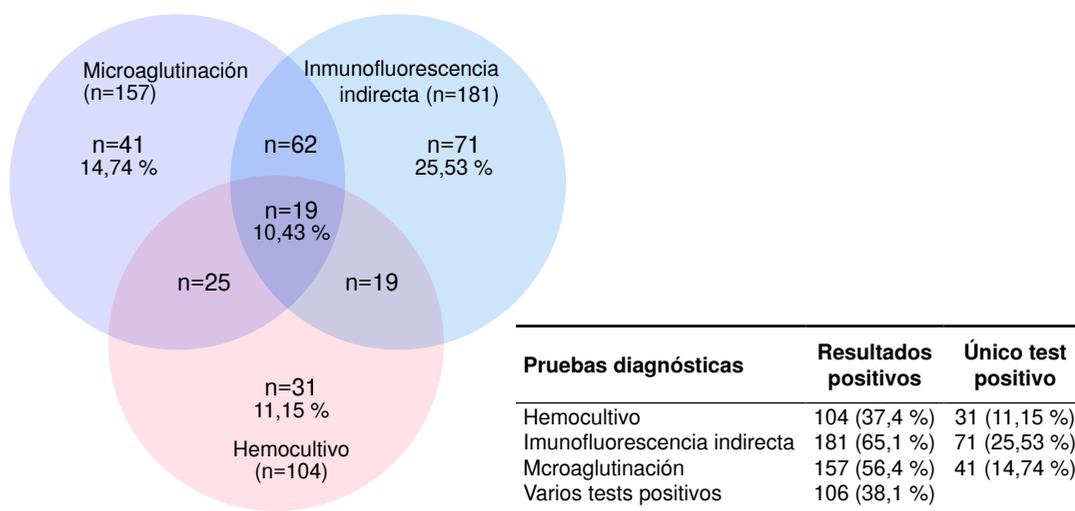


Figura 2. Casos positivos según la prueba utilizada para el diagnóstico de leptospirosis, Urabá, 2010-2012

en 29/199 pacientes (14,57 %), *Leptospira interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae en 23/199 (11,56 %) y el serogrupo Sejroe en 20/199 (10,05 %). Otros serogrupos, como Australis, Tarassovi, Grippotyphosa, Shermani, Cynopteri, Canicola, Panama, Pomona y Barranquilla, registraron una frecuencia menor de 10 %, en tanto que el porcentaje de coagulación fue de 17,59 % (35/199 casos).

En el cuadro 1 se presentan algunas características demográficas de los pacientes con leptospirosis incluidos en el estudio; se observó una mayor proporción de casos en hombres (186/278, 66,91 %), en habitantes de la zona urbana (198/278, 71,48 %), en los mestizos (130/278, 49,81 %) y en aquellos con edades entre los 20 y los 49 años (169/278, 61,23 %).

Cuadro 1. Características demográficas de la población incluida en el estudio (eje bananero, Urabá), 2010-2012

	Pacientes positivos		Pacientes negativos		p
	n	(%)	n	(%)	
Sexo					
Mujer	92	(33,09)	123	(61,2)	0,117
Hombre	186	(66,91)	78	(38,8)	
Zona de vivienda*					
Urbana	198	(71,48)	143	(71,1)	0,399
Rural	79	(28,52)	55	(27,4)	
Grupo étnico					
Blanco	87	(33,33)	169	(37,31)	0,591
Mestizo	130	(49,81)	208	(45,92)	
Negro	40	(15,33)	66	(14,57)	
Indígena	4	(1,53)	4	(0,88)	
Edad (años)*					
5-19	87	(31,52)	59	(24,18)	0,000
20-49	169	(61,23)	107	(43,85)	
>50	20	(7,25)	78	(31,97)	
Ocupación*					
Sector agropecuario	18	(6,27)	10	(4,98)	0,000
Sector bananero	22	(7,67)	14	(6,97)	
Militar	28	(9,76)	15	(7,46)	
Ama de casa	35	(12,20)	39	(19,40)	
Menor/estudiante	84	(29,27)	57	(28,36)	
Otras	100	(34,84)	66	(32,84)	

* Variables con valores perdidos, por zona de vivienda: un caso (0,35 %); por edad: dos casos (0,7 %); por grupo étnico: 17 casos (6,1 %); por ocupación: 18 casos (6,4 %)

No hubo asociación estadísticamente significativa entre la procedencia y la raza con respecto a la positividad ($p=0,399$ y $0,591$, respectivamente) (cuadro 1).

En el cuadro 2 se presentan la distribución de los casos por año y por municipio, y las tasas de incidencia, crudas y ajustadas por edad, durante el período de estudio. Los 278 casos de leptospirosis diagnosticados suponen una incidencia acumulada total de 264 casos por 100.000 habitantes en los cuatro municipios del eje bananero, en tanto que los 145 casos registrados en el 2010 suponen una incidencia acumulada de 35,43/100.000 habitantes.

Para determinar el subregistro, se optó por trabajar con los datos del 2010 porque se ajustaban más a la realidad del proceso de vigilancia epidemiológica de los municipios del eje bananero antes del estudio. Para los años siguientes, se hizo el ajuste de la notificación al Sivigila con los casos que se diagnosticaron en el marco del presente estudio.

Cuadro 2. Distribución de los casos de leptospirosis incluidos en el estudio y registro de incidencia por municipios del eje bananero, Urabá, 2010-2012

	Apartadó		Carepa		Chigorodó		Turbo		Total de casos por año	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
2010	69	(45,7)	8	(25,8)	9	(69,2)	59	(71,1)	145	(52,2)
2011	70	(46,4)	17	(54,8)	3	(23,1)	21	(25,3)	111	(39,9)
2012	12	(7,9)	6	(19,4)	1	(7,7)	3	(3,6)	22	(7,9)
Total de casos por municipio	151	100	31	100	13	100	83	100	278	100
Incidencia cruda por 100.000 habitantes	95,5		59,5		20,3		57,8			
Incidencia ajustada por edad por 100.000 habitantes	90		60		20		50			

En la figura 3, se presentan los canales endémicos basados en la información oficial (Sivigila) para el país, el departamento, la región de Urabá y los municipios del eje bananero. Se puede observar la endemia de la leptospirosis en todas las zonas, con una tendencia hiperendémica a partir del periodo epidemiológico ocho antes del inicio de la segunda temporada anual de lluvias, tendencia que se mantuvo hasta finalizar el año. Los cuatro municipios del eje bananero aportaron el 88,67 % de los casos de la región de Urabá.

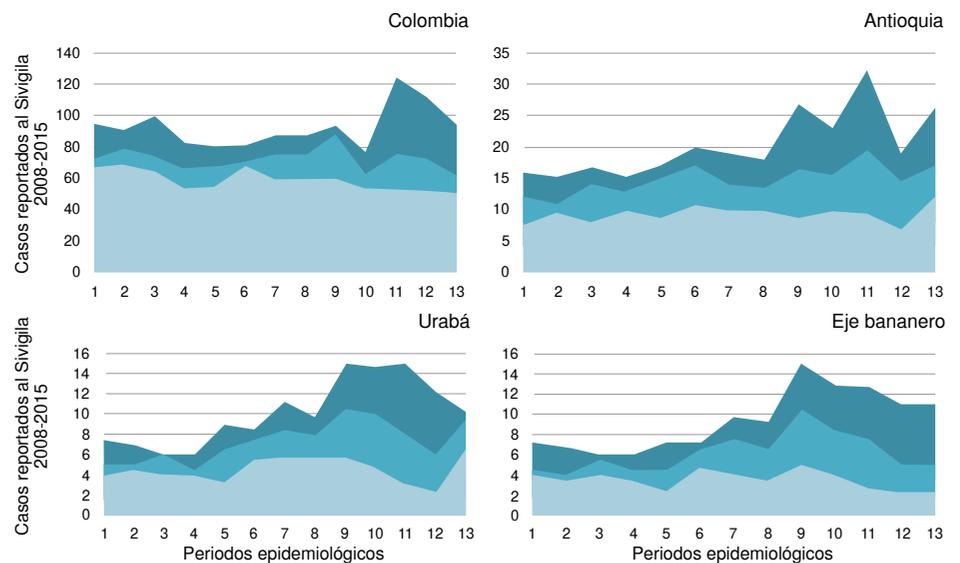
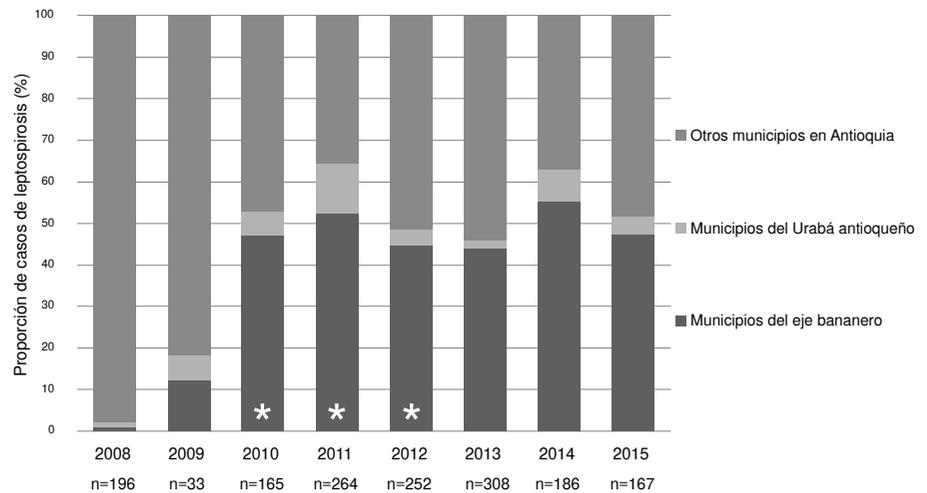


Figura 3. Canal endémico de leptospirosis según los casos reportados por el Sivigila (2008-2015) en Colombia, en Antioquia, en la región de Urabá y en el eje bananero (municipios de Apartadó, Carepa, Chigorodó y Turbo). Se observa endemia en todas las zonas, con una tendencia hiperendémica a partir del periodo epidemiológico ocho y hasta finalizar el año. Los municipios del eje bananero aportaron el 88,67 % de los casos de la región de Urabá.

En la figura 4 se presenta la distribución proporcional de los casos entre el 2008 y el 2015 según la notificación al Sivigila en los cuatro municipios de estudio, en los demás municipios de la región de Urabá y en los municipios restantes del departamento de Antioquia. Se observó una tendencia al aumento en el reporte de casos de los municipios de la región de Urabá, que se mantuvo constante a partir del 2010. El eje bananero reportó proporciones por encima del 40 % a partir de ese año.



* Periodo del estudio

Figura 4. Casos de leptospirosis por año en Antioquia reportados en el Sivigila (2008-2015) discriminados según la procedencia: municipios del eje bananero, Urabá antioqueño y resto del departamento de Antioquia. Se observó una tendencia al aumento en el reporte de casos de los municipios de la región de Urabá, con reportes constantes a partir del 2010. A partir de esta fecha, en el eje bananero se reportaron proporciones por encima del 40 %.

Según las estimaciones hechas mediante el método de captura y recaptura, se debieron haber notificado al Sivigila 230 casos de leptospirosis en los municipios del eje bananero durante el 2010 ($IC_{95\%}$ 191-269), y la incidencia estimada mediante este mismo método debió haber oscilado entre 46,66 y 65,72 por 100.000 habitantes.

De los 126 pacientes notificados en el estudio, 56 también fueron reportados al Sivigila y 70 no, en tanto que el total de los que no se notificaron al Sivigila fue de 104. Con esta información y con el método propuesto, se calculó la exhaustividad en la captación de pacientes con ambas fuentes de información (el presente estudio y la información del Sivigila), porcentaje equivalente al 72,12 %, lo que implica que, incluso tomando los datos de las dos fuentes, el 27,88 % de casos de leptospirosis en el 2010 no fueron diagnosticados. En la figura 5 se presenta el porcentaje de casos registrados en el Sivigila, discriminado por municipio y por año.

El total de casos notificados al Sivigila por los cuatro municipios durante el período de estudio, fue de 69, mientras que el estudio captó 278 casos en forma activa, es decir que el subregistro oficial fue de 75,18 %. Durante el 2012, no se reportó ningún caso al Sivigila en Chigorodó y solo un paciente de este municipio se incluyó en el estudio. En la figura 5, se presenta el subregistro de los municipios de estudio, Apartadó, Carepa, Chigorodó y Turbo, en cada uno de los años. La proporción de casos que no se registraron fue de 75,86 % en el 2010, de 76,58 % en el 2011 y de 63,64 % en el 2012.

Durante el período de estudio, se notificaron dos casos fatales al Sivigila, uno de ellos procedente del municipio de Apartadó y otro del municipio de Turbo, aunque en el estudio se documentaron seis casos fatales, lo cual indica que hubo cuatro casos fatales que no se notificaron al Sivigila, para una proporción de letalidad por leptospirosis del 2,15 % en los municipios del eje bananero, una tasa de mortalidad de 1,27 por 100.000 habitantes y un subregistro de la letalidad del 66,6 % (4/6).

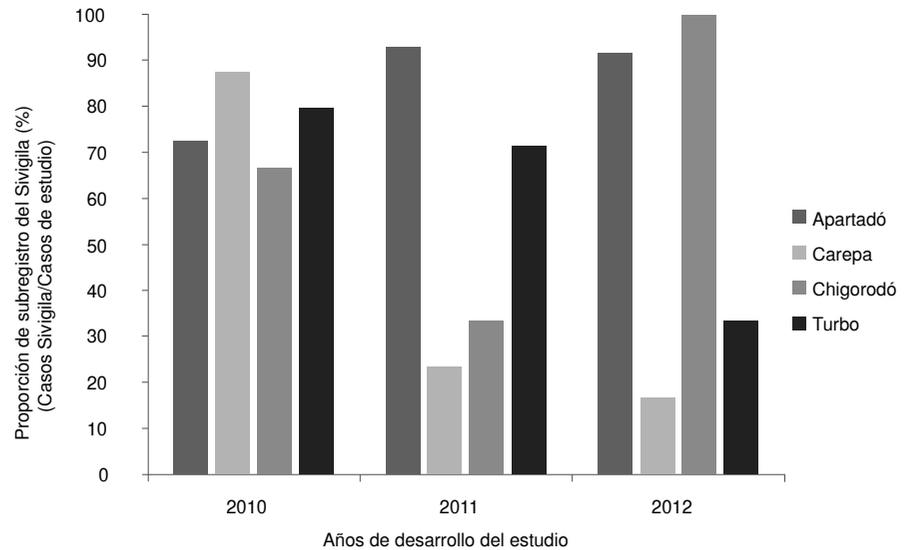


Figura 5. Proporción de los casos no registrados en el Sivigila (2010-2012) según los reportes del presente estudio discriminados por los municipios del eje bananero

Discusión

Los resultados del presente estudio evidenciaron 278 (58,03 %) pacientes positivos para leptospirosis en, al menos, una de las pruebas utilizadas: hemocultivo, detección de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta o microaglutinación, en la fase aguda o la fase convaleciente de una cohorte de 479 pacientes febriles captados en los municipios del eje bananero. Este porcentaje de positividad en los pacientes febriles superó lo descrito en otros estudios de caracterización de la etiología del síndrome febril agudo en Colombia. Arroyave, *et al.*, encontraron 14,1 % de positividad de leptospirosis mediante inmunofluorescencia indirecta en pacientes de tres municipios de Urabá (20). En el departamento del Quindío se reportaron porcentajes de positividad mediante microaglutinación de 6,8 % en el 2016 (17) y de 5,7 % y 4,7 % en el 2005 y el 2006, respectivamente (6). Estas diferencias probablemente se explican por el uso de un único método diagnóstico con diferentes sensibilidades y especificidades en cada estudio.

El diagnóstico de la leptospirosis es complejo; una única prueba de laboratorio no lo garantiza por sí misma, y se recomienda que, en los pacientes con sospecha de tenerla, se utilicen, por lo menos, dos pruebas de laboratorio, preferentemente, una serológica acompañada de una microbiológica o molecular (4).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los protocolos del Instituto Nacional de Salud de Colombia, la prueba estándar para el diagnóstico de la enfermedad es la detección de anticuerpos mediante microaglutinación (21,22). Sin embargo, el diagnóstico estandarizado en la red nacional de laboratorios de salud pública es la detección de anticuerpos IgM mediante ELISA, lo que restringe la determinación exclusivamente a la fase aguda, excluyendo la fase de convalecencia.

En cuanto a la microaglutinación, se puede afirmar que su sensibilidad depende del panel de serovares disponible en el laboratorio, lo que puede limitar el diagnóstico (21-23) cuando no se incluyen cepas nativas de las áreas endémicas (24). Esto se hizo evidente en el presente estudio al incluir

la cepa nativa JET, aislada de un paciente procedente del municipio de Apartadó, en el panel de diagnóstico de la microaglutinación (25), ya que ello mejoró la captación de pacientes positivos en 15 % con respecto al panel convencional, diferencia estadísticamente significativa.

El 11,1 % (31/278) de los pacientes del estudio con resultado negativo en la inmunofluorescencia indirecta y la microaglutinación, se diagnosticó únicamente por cultivo. Aunque el cultivo es un método imperfecto, representa una posibilidad diagnóstica en aquellos casos en que no desarrollan anticuerpos contra *Leptospira* spp. En este estudio se hizo el seguimiento de los hemocultivos durante nueve meses, seis meses más de los recomendados por la OMS (21), lo cual pudo contribuir al notable rendimiento alcanzado pues, en un poco más de la tercera parte de los casos (37,4 %; 104/278), el diagnóstico se obtuvo por este medio.

Desde el punto de vista epidemiológico, la información que aporta el cultivo es muy importante, aunque no es útil como apoyo para definir el tratamiento. Dadas las limitaciones del cultivo, las pruebas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituyen una alternativa diagnóstica (26). Sin embargo, cuando no se cuenta con la infraestructura necesaria para el diagnóstico molecular en los primeros niveles de atención (instalaciones especiales, capacitación y experiencia del personal, y nivel de seguridad, entre otros), el diagnóstico puede hacerse mediante dos pruebas simples y muy sensibles: la de campo oscuro de la orina y una prueba rápida validada con serovares nativos de las zonas endémicas, para garantizar un tratamiento más específico. En el diagnóstico de pacientes de áreas endémicas para leptospirosis, se considera válida la combinación de las pruebas básicas de laboratorio con los criterios clínicos definidos (como los descritos y modificados por Faine en 1999), especialmente, en lugares con pocos recursos para implementar otro tipo de métodos diagnósticos (27,28).

El contexto de la epidemiología dinámica de la enfermedad determina que las poblaciones expuestas a los factores de riesgo dejaron de ser exclusivamente del área rural y de las ocupaciones de riesgo (trabajadores del agro, ganaderos, veterinarios, etc.), como lo demuestran los resultados del presente estudio, en el que la mayoría de los casos correspondió a personas procedentes del área urbana (198/278 71,48 %), hallazgos similares a los reportados en la literatura médica (2,29). En este mismo sentido, en un estudio de seroprevalencia de la leptospirosis en la región de Urabá publicado en el 2007, se reportó un perfil sociodemográfico similar (30), lo que demuestra que otros factores ambientales (lluvias, inundaciones, mascotas, animales sinantrópicos, prácticas deportivas, etc.) han contribuido a modificar el comportamiento epidemiológico y de los factores de riesgo de la enfermedad, especialmente, en los sectores urbanos deprimidos con deficientes condiciones higiénicas y sanitarias (31).

Este cambio epidemiológico y el subregistro de los casos de leptospirosis tienen implicaciones clínicas, pero también subestiman la carga de la enfermedad y sus implicaciones económicas. En el 2015, el 79,6 % de los pacientes diagnosticados con leptospirosis en Colombia requirió manejo hospitalario, y el 53 % estaba asegurado en el régimen subsidiado por el Estado (12); el tiempo de incapacidad fue de cerca de 12 días, con la consecuente ausencia del lugar de trabajo, lo cual se traduce no solo en un costo adicional para el empleador, sino también para la economía de la región, que depende del sector productivo primario y de su mano de obra.

Los cuatro municipios incluidos del eje bananero, (Turbo, Apartadó, Carepa y Chigorodó) representan el 6,74 % de la población de Antioquia y notifican más del 40 % del total de casos de leptospirosis del departamento. Los 145 casos incluidos en el estudio durante el 2010, representan una tasa de incidencia de 35,4 casos por 100.000 habitantes, lo que superó las tasas promedio de Antioquia (2,72 por 100.000 habitantes) y de Colombia (2,71 por 100.000 habitantes), estimadas oficialmente para ese mismo año, así como las de otras regiones en el país (eje cafetero, con 23,41 casos por 100.000 habitantes en el 2011) (32) y en Latinoamérica (Lima: 56,3 por 100.000 habitantes) (2).

En su estudio sobre la dinámica espacio-temporal de la leptospirosis humana y la relación con las anomalías climáticas, Gutiérrez, *et al.*, determinaron uno de los seis conglomerados con mayor número de casos de leptospirosis humana en Colombia, correspondiente a los municipios del eje bananero, y lo asociaron con la incidencia del comportamiento endémico y a una mayor descarga de lluvias debida, probablemente, al fenómeno de La Niña, entre otros aspectos (33).

En este mismo sentido, en los canales endémicos basados en la información del Sivigila, se evidenció una clara tendencia al aumento, principalmente en los municipios de la región de Urabá, a partir de los últimos cinco períodos epidemiológicos del año, época en la cual suelen aumentar las lluvias y, por ende, las aguas estancadas y servidas que aumentan la exposición y el riesgo de desarrollar la enfermedad. Esta observación está documentada por los mismos autores en su estudio sobre agrupaciones de leptospirosis humana en los municipios del eje bananero (33).

En Urabá hay un elevado registro de la enfermedad, lo que evidencia los esfuerzos continuos de búsqueda de síndromes febriles sugestivos de leptospirosis y el compromiso de los funcionarios del área de la salud con su notificación, lo cual se ha reflejado en su incremento a partir de la realización de este estudio, como se muestra en la figura 3. Probablemente, la búsqueda activa de los casos contribuyó al aumento de la incidencia en esta zona, aunque se sigue evidenciando un subregistro notable en los datos de vigilancia, lo cual se asociaría indirectamente con el hecho de no disponer de pruebas diagnósticas eficientes en la red de laboratorios de salud pública.

En la revisión sobre la vigilancia de la leptospirosis en las Américas entre 1996 y 2005, se evidenció la falta de datos sobre la enfermedad, lo cual refleja las deficiencias de los sistemas de vigilancia, la poca observancia de la notificación obligatoria, la debilidad del diagnóstico por el laboratorio y de la capacidad para recolectar los casos notificados, así como la urgencia de detectar tempranamente los brotes, hacer un seguimiento preciso de los patrones regionales y establecer la carga de la enfermedad (2,34).

Entre el 2010 y el primer semestre de 2012, no se registraron casos fatales por malaria y solo una muerte por dengue (35), en tanto que se documentaron seis casos fatales de leptospirosis: tres del municipio de Apartadó, dos de Turbo y uno de Chigorodó, lo cual indica una proporción de letalidad de 2,15 % en los municipios del eje bananero. Estos hallazgos reiteran el planteamiento de que la leptospirosis representa un grave problema de morbimortalidad en la región de Urabá que no se ve reflejado en el sistema de vigilancia.

Asimismo, se observó que la notificación de la letalidad de la enfermedad en el Sivigila no es la adecuada, pues se reportaron solo dos de los seis casos encontrados en el presente estudio. En Puerto Rico, se dejaron de notificar 20 casos de leptospirosis y cinco muertes por esta misma causa, entre el 2000 y

el 2009, lo que indica que no se notificó entre el 60 y el 90 % de la letalidad, datos comparables a los encontrados en el presente estudio (36).

El subregistro promedio del 72 % de los casos y del 66 % de los fallecidos en la región es considerablemente alto. Los 230 casos de leptospirosis que debieron haberse notificado al Sivigila suponen una incidencia estimada que debió haber oscilado entre 46,66 y 65,72 por 100.000 habitantes, tasa cinco veces mayor que la registrada en ese Sistema en el 2010 para los municipios del eje bananero, la cual fue de 11,365 por 100.000 habitantes. Un estudio de leptospirosis humana en Brasil, en el cual se empleó el método de captura y recaptura, reportó un subregistro 20 veces mayor que el estimado por las fuentes oficiales (37). Este subregistro debe alertar a las autoridades sanitarias para garantizar un mejor acceso al diagnóstico en la red de laboratorios de salud pública, ya que la detección de anticuerpos mediante ELISA, usualmente en fase aguda, es insuficiente por sí sola para dar cuenta de esta enfermedad endémica en los municipios del estudio.

Este panorama plantea la necesidad de que la red nacional de laboratorios de salud pública adopte, por lo menos, una prueba complementaria, preferentemente microbiológica, u otra prueba serológica para la vigilancia de leptospirosis, medida que contribuiría a mejorar el diagnóstico de la enfermedad y, en consecuencia, el perfil epidemiológico, al disminuir el subregistro actual. Además, las pruebas moleculares basadas en la PCR son una alternativa diagnóstica ya validada en Colombia (38).

En conclusión, es necesario disponer, por lo menos, de dos pruebas diagnósticas debido a la historia natural de la enfermedad, el comportamiento de la bacteria, el corto periodo de leptospiremia y el desarrollo retardado o la ausencia de anticuerpos en algunos pacientes (24,39). Asimismo, el diagnóstico oportuno y preciso de la leptospirosis en los pacientes febriles de las zonas endémicas para otras enfermedades, como dengue, chikungunya y Zika, puede mejorar el pronóstico, pues permite un tratamiento adecuado y disminuir el subregistro de esta enfermedad en forma significativa.

Referencias

1. Chikeka I, Dumler JS. Neglected bacterial zoonoses. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:404-15. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.04.022>
2. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, *et al.* Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>
3. Dolhnikoff M, Mauad T, Bethlem EP, Carvalho CR. Leptospiral pneumonias. *Curr Opin Pulm Med.* 2007;13:230-5. <https://doi.org/10.1097%2FMCOP.0b013e3280f9df74>
4. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz 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](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2)
5. Adler B. *Leptospira and leptospirosis.* Berlín: Springer Berlin Heidelberg; 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8>
6. Sánchez-Vallejo G, Gómez-Marín J, Quintero-Álvarez L, Castaño-Cotrino M. Características clínicas y epidemiológicas de la leptospirosis en el departamento del Quindío, 2005-2006. *Infectio.* 2008;12:325-31.
7. Padmanabha H, Hidalgo M, Valbuena G, Castañeda E, Galeano A, Puerta H, *et al.* Geographic variation in risk factors for SFG rickettsial and leptospiral exposure in Colombia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2009;9:483-90. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0092>
8. Bravo C, Restrepo R, Pérez G. Leptospirosis in Antioquia. Preliminary communication. *Antioquia Med.* 1966;16:534-4.

9. Epstein PR, Calix-Peña O, Blanco-Racedo J. Climate and disease in Colombia. *Lancet*. 1995;346:1243-4. [https://thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(95\)91856-6/fulltext](https://thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(95)91856-6/fulltext)
10. Bello S, Rodríguez M, Paredes A, Mendivelson F, Walteros D, Rodríguez F, *et al*. Comportamiento de la vigilancia epidemiológica de la leptospirosis humana en Colombia, 2007-2011. *Biomédica*. 2013;33:153-60. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.1608>
11. Ferro BE, Rodríguez AL, Pérez M, Travi BL. Seroprevalencia de infección por *Leptospira* en habitantes de barrios periféricos de Cali. *Biomédica*. 2006;26:250-7. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i2.1414>
12. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico. Semana 52 de 2015. Sivigila. Fecha de consulta; 24 de abril del 2019, <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2015%20Boletin%20epidemiologico%20Semana%2052.pdf>
13. Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud. Guía para la atención clínica integral del paciente con dengue. Bogotá: Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud; 2010.
14. Yuszniaty Y, Kenneth FR, Daisy Vanitha J. Leptospirosis: Recent incidents and available diagnostics - a review. *Med J Malaysia*. 2015;70:351-5.
15. Agudelo-Flórez P, Restrepo M, Lotero MA. Evaluación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de leptospirosis humana. *Biomédica*. 2006;26:216-23. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i2.1411>
16. Agudelo-Flórez P, Durango H, Aranzazu D, Rodas JD, Travi B. Genotipificación y evaluación de la dinámica de infección de un aislamiento colombiano de *Leptospira santarosai* en el modelo experimental hámster. *Biomédica*. 2014;34:460-72. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i3.1703>
17. Rodríguez-Salazar CA, Recalde-Reyes DP, González MM, Padilla-Sanabria L, Quintero-Álvarez L, Gallego-Gómez JC, *et al*. Manifestaciones clínicas y hallazgos de laboratorio de una serie de casos febriles agudos con diagnóstico presuntivo de infección por el virus dengue. Quindío (Colombia). *Infectio*. 2016;20:84-92. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2015.08.003>
18. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de vigilancia en salud pública. Leptospirosis Cod. 455. Fecha de consulta: 24 de abril de 2015. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Lineamientos/PRO%20Leptospirosis.pdf>
19. Xunta de Galicia, Consellería de Sanidade e o Servizo Galego de Saúde. Epidat 3.1. Fecha de consulta: 27 de abril de 2018. Disponible en: https://www.xunta.gal/tema/c/Saude_asistencia_sanitaria_e_servizos_sociais
20. Arroyave E, Londoño AF, Quintero JC, Agudelo-Flórez P, Arboleda M, Díaz FJ, *et al*. Etiología y caracterización epidemiológica del síndrome febril no malárico en tres municipios del Urabá antioqueño, Colombia. *Biomédica*. 2013;33:99-107. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.734>
21. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, International Leptospirosis Society. Leptospirosis humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Fecha de consulta: 7 de febrero de 2015. Disponible en: <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/guia-esp.pdf>
22. Guerra MA. Leptospirosis: Public health perspectives. *Biol J Int Assoc Biol Stand*. 2013;41:295-7. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.06.010>
23. Budihal SV, Perwez K. Leptospirosis diagnosis: Competency of various laboratory tests. *J Clin Diagn Res*. 2014;8:199-202. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/6593.3950>
24. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect*. 2013;43:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>
25. Peláez-Sánchez RG, López JÁ, Pereira MM, Arboleda-Naranjo M, Agudelo-Flórez P. Genetic diversity of *Leptospira* in northwestern Colombia: First report of *Leptospira santarosai* as a recognized leptospirosis agent. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111:737-44. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160245>
26. Moreno N, Agudelo-Flórez P. Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2010;27:548-56.
27. Bandara K, Weerasekera MM, Gunasekara C, Ranasinghe N, Marasinghe C, Neluka F. Utility of modified Faine's criteria in diagnosis of leptospirosis. *BMC Infect Dis*. 2016;16:1-7. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1791-9>

28. Haake D. Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;387:65-97. https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-662-45059-8_5
29. Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, Kalofonos I, *et al.* Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:605-10. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.605>
30. Agudelo-Flórez P, Restrepo-Jaramillo BN, Arboleda-Naranjo M. Situación de la leptospirosis en el Urabá antioqueño colombiano: estudio seroepidemiológico y factores de riesgo en población general urbana. *Cad Saúde Pública.* 2007;23:2094-102. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2007000900017>
31. Hagan JE, Moraga P, Costa F, Capian N, Ribeiro GS, Wunder EA, *et al.* Spatiotemporal determinants of urban leptospirosis transmission: Four-year prospective cohort study of slum residents in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004275>
32. García-Ramírez LM, Giraldo-Pulgarín JY, Agudelo-Marín N, Holguín-Rivera YA, Gómez-Sierra S, Ortiz-Revelo PV, *et al.* Geographical and occupational aspects of leptospirosis in the coffee-triangle region of Colombia, 2007-2011. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2015;10:42-50. <https://doi.org/10.2174/1574891X10666150410130425>
33. Gutiérrez JD, Martínez-Vega RA. Spatiotemporal dynamics of human leptospirosis and its relationship with rainfall anomalies in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2018;112:115-23. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try032>
34. Costa F, Martínez-Silveira MS, Hagan JE, Hartskeerl RA, Dos Reis MG, Ko AI. Surveillance for leptospirosis in the Americas, 1996-2005: A review of data from ministries of health. *Pan Am J Public Health.* 2012;32:169-77. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892012000900001>
35. Secretaría Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia. Mortalidad general por subregión/municipio, 2015-17. Fecha de consulta: 24 de abril de 2019. Disponible en: <http://dssa.gov.co/index.php/estadisticas/mortalidad/item/83-mortalidad-enfermedades-transmitidas-por-vectores-por-subregion-municipio-2005-2017>
36. Centers for Disease Control and Prevention. Notes from the field: Investigation of leptospirosis underreporting - Puerto Rico, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012;61:421.
37. Brum L, Kupek E. Record linkage and capture-recapture estimates for underreporting of human leptospirosis in a Brazilian health district. *Braz J Infect Dis.* 2005;9:515-20. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702005000600011>
38. Agudelo-Flórez P, Moreno N, Restrepo M. Diagnóstico de leptospirosis de muestras de sangre y cultivo por observación en microscopio de campo oscuro. *Biomédica.* 2008;28:7-9. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v28i1.103>
39. Jaiswal N, Chandrasekaran S, Padmavathy B. Dark field microscopy an important conventional technique for the early diagnosis of leptospirosis. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2015;4:718-22.

Comunicación breve

Serorreacción y prevalencia de sífilis en donantes de un banco de sangre de Barranquilla, Colombia

Juan Carlos Martínez-Garcés¹, Michael Macías-Vidal¹, Ronald Maestre-Serrano², Ricardo Ávila-De la Hoz¹, Eduardo Navarro-Jiménez², Johan Bula-Viecco¹, Lisbeth Ricaurte-Barrera¹

¹Banco Nacional de Sangre, Barranquilla, Colombia

²Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Simón Bolívar, Barranquilla, Colombia

Introducción. La sífilis es una enfermedad de interés en salud pública por sus elevadas tasas de morbilidad y mortalidad.

Objetivo. Determinar la serorreacción y la seroprevalencia de sífilis según las variables sociodemográficas de los donantes de un banco de sangre del distrito de Barranquilla, Colombia, durante 2015 y 2016.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo de corte transversal basado en los resultados de las pruebas treponémicas y no treponémicas. Se analizaron las variables sociodemográficas de la población estudiada y se hizo un análisis univariado en el que se determinaron las frecuencias absoluta y relativa de cada una de las variables categóricas. Se determinó la serorreacción a *Treponema pallidum* y la prevalencia de la infección activa. Se utilizó la prueba de ji al cuadrado de Pearson para evaluar las diferencias entre las proporciones.

Resultados. Se encontró una serorreacción de 1,86 % para la infección previa con *T. pallidum* y una prevalencia de 0,93 % para la infección activa, las cuales fueron más altas en hombres adultos y en adultos mayores, viudos, desempleados y personas residentes en otros municipios del departamento de Atlántico diferentes de Barranquilla y su área metropolitana. Se encontró una asociación significativa entre la sífilis y las variables de sexo y ocupación.

Conclusión. Se registró una serorreacción elevada a *T. pallidum* en donantes de sangre, comparada con el promedio nacional. Se encontró asociación entre la sífilis, y las variables sociodemográficas de sexo y ocupación, principalmente.

Palabras clave: sífilis; *Treponema pallidum*; donantes de sangre; estudios seroepidemiológicos; bancos de sangre.

Seroreactivity and prevalence of syphilis in donors at a blood bank in Barranquilla, Colombia

Introduction: Syphilis is a public health concern given its high impact on morbidity and mortality.

Objective: We aimed to determine the association of syphilis seroreactivity and seroprevalence with sociodemographic variables of donors at a blood bank in the district of Barranquilla, Colombia, during 2015 and 2016.

Materials and methods: We conducted a descriptive cross-sectional study based on the results of the treponemal and nontreponemal tests and the sociodemographic variables of the study population. We performed a univariate analysis to determine the absolute and relative frequencies for each categorical variable. We determined the seroreactivity against *Treponema pallidum* and the prevalence of active syphilis infection, and we used Pearson's chi-square test to evaluate the differences between the proportions.

Results: We found a seroreactivity of 1.86% in individuals with previous *T. pallidum* infection, and a prevalence of 0.93% in those with active *T. pallidum* infection. These values were higher in adult men and older adults, widowers, the unemployed, and people living in municipalities of the Department of Atlántico other than Barranquilla and its metropolitan area. The incidence of syphilis infection showed a significant association with sex and occupation.

Conclusion: In comparison to the national average, syphilis seroreactivity was high among blood donors. There was an association between syphilis infection incidence and sociodemographic variables such as sex and occupation.

Keywords: Syphilis; *Treponema pallidum*; blood donors; seroepidemiologic studies; blood banks.

La sífilis es una infección de transmisión sexual causada por la bacteria *Treponema pallidum*, la cual se transmite por contacto sexual, por transfusión de hemocomponentes o de la madre al feto durante el embarazo. La sífilis es de

Recibido: 13/12/17
Aceptado: 13/08/18
Publicado: 13/08/18

Citación:

Martínez-Garcés JC, Macías-Vidal M, Maestre-Serrano R, Ávila-De la Hoz R, Navarro-Jiménez E, Bula-Viecco J, Ricaurte-Barrera L. Serorreacción y prevalencia de sífilis en donantes de un banco de sangre de Barranquilla, Colombia. Biomédica. 2019;39(Supl.1):163-71
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i1.4245>

Correspondencia:

Juan Carlos Martínez-Garcés, Banco Nacional de Sangre, Carrera 50 N° 80-192, Barranquilla, Colombia
Teléfono: (317) 379 3988
juancarlosmartinez033@gmail.com

Contribución de los autores:

Todos los autores participaron en todas las fases de este estudio.

Financiación:

Banco Nacional de Sangre y Universidad Simón Bolívar, Barranquilla, Colombia

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

interés en salud pública a nivel mundial por su impacto en la morbilidad y en la mortalidad, especialmente, en las mujeres gestantes y en la población infantil. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente se registran, aproximadamente, 12 millones de casos de la enfermedad, tres millones de ellos en países de Latinoamérica y el Caribe (1), cifras que no reflejan la magnitud y la distribución reales de la enfermedad, pues en muchos de estos países hay subregistro y deficiencias en la notificación (2).

La sífilis fue la primera infección descrita como transmisible por transfusiones (3) y su epidemiología es de gran interés debido al aumento constante en la demanda de sangre y hemoproductos en los servicios de salud. Para satisfacer dicha demanda con componentes seguros y evitar la transmisión de infecciones por esta vía, se han empleado medidas como la promoción de la donación voluntaria, la selección de donantes mediante entrevistas y cuestionarios, los incentivos para abstenerse de donar, el registro de donantes rechazados y el uso de pruebas de tamización en concordancia con lo estipulado en la legislación nacional (4-7).

A pesar de que los casos de transmisión de la infección por esta vía son excepcionales, la tamización para la sífilis en los donantes es importante debido a las conductas de riesgo asociadas con la enfermedad, así como su elevada prevalencia en poblaciones de riesgo (3).

A partir de los resultados de estas pruebas, la Red Nacional de Bancos de Sangre de Colombia reportó seroprevalencias a nivel nacional entre 1,30 y 1,51 entre 2012 y 2016, periodo durante el cual los departamentos de Caquetá, Risaralda, Meta, Magdalena, Sucre, Cesar y Atlántico presentaron las mayores prevalencias (8-12). Se desconoce la prevalencia real de la enfermedad en la población general, por lo que estos reportes constituyen la información más precisa con la que se cuenta.

Asimismo, en el país solo se notifica obligatoriamente la sífilis gestacional y la congénita. En los últimos años, se ha reportado un aumento de la incidencia de la sífilis gestacional, que pasó de 1,3 por 1.000 nacidos vivos en el 2003, a 6,0 por 1.000 nacidos vivos en el 2016, en tanto que se observó un aumento de la incidencia de la sífilis congénita de 0,9 por 1.000 nacidos vivos en el 2003 a 1,02 por 1.000 nacidos vivos en el 2016 (13).

Aunque en el país hay un protocolo para detectar y tratar los casos de sífilis en las mujeres embarazadas, la realidad es distinta para el resto de la población, pues no se cuenta con un sistema de vigilancia en 'tiempo real' que permita registrar estos casos y conocer la situación de la enfermedad en la población general (13). Además, se sabe que muchos casos de sífilis cursan de manera asintomática, por lo cual no demandan atención de los servicios de salud. En otros estudios, también se ha podido determinar que hace falta educación sobre el diagnóstico y la notificación de los casos de sífilis (14), por lo que es muy probable que haya subregistro de la sífilis en la población general.

En ausencia de estudios de prevalencia de la sífilis en la población general, y dado lo poco práctico que resultaría la tamización de toda la población y los costos que implicaría, en el presente estudio se presentan los datos generados por un banco de sangre de Barranquilla, con el fin de evidenciar aspectos de la epidemiología de la sífilis en la población de donantes de sangre y aportar información que permita calcular la frecuencia de la infección en la población general y focalizar estrategias de prevención, diagnóstico y control.

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en el departamento del Atlántico, ubicado en la región Caribe colombiana entre los 10°15'36" y los 11° 06'37" N y los 74°42'47" y 75°16'34" O. El departamento del Atlántico tiene una población de 2'489.709 habitantes, de los cuales el 49,16 % (1'223.967 habitantes) se concentran en el distrito de Barranquilla y, el 33,18 % (826.160 habitantes), en los municipios de su área metropolitana (Soledad, Malambo, Galapa y Puerto Colombia), según datos de la gobernación del Atlántico en su plan de desarrollo, 2016-2019. El distrito de Barranquilla cuenta con cinco bancos de sangre de carácter privado y el estudio se desarrolló en el Banco Nacional de Sangre, uno de los de mayor captación de donantes, el cual recolecta y procesa anualmente el 40 %, aproximadamente, de las unidades de sangre de todo el departamento.

El estudio fue descriptivo de corte transversal. Se analizaron los resultados de las pruebas de sífilis y se contrastaron con la información demográfica de los donantes de sangre total y aféresis que asistieron a la institución entre enero de 2015 y diciembre de 2016. Se excluyeron los registros de los donantes de sangre provenientes de otros departamentos.

El estado serológico de los donantes frecuentes se estableció con base en los datos de su última donación durante el período de estudio. Solo se evaluaron los datos de los individuos que habían donado con éxito, es decir, aquellos que fueron seleccionados y de los cuales se obtuvo una unidad de sangre.

Las variables sociodemográficas incluyeron edad, sexo, estado civil, régimen de afiliación en salud, ocupación, municipio de residencia, barrio y localidad en el caso de los residentes en Barranquilla. Las variables de laboratorio incluyeron el resultado de la prueba de tamización y el de la prueba confirmatoria.

Los resultados para sífilis de todas las donaciones de sangre se obtuvieron mediante una prueba de inmunoanálisis por quimioluminiscencia de micropartículas, para la detección cualitativa de anticuerpos IgG e IgM para *T. pallidum* en suero (Architect Syphilis TP™, Abbott Diagnostics, Illinois, USA).

En concordancia con las normas nacionales, se usó esta prueba treponémica para la tamización inicial, ya que permite detectar la infección presente o pasada. Si se registraba reacción, se procedía a hacer una nueva prueba por duplicado con la misma técnica en la misma muestra y la bolsa de sangre correspondiente; si en alguna de estas dos pruebas había reacción, se procedía a hacer la prueba no treponémica de reagina plasmática rápida (Reditest™, Biokit, S. A., Barcelona, España), como lo indica la Circular 0082 de 2011 y sus correspondientes anexos técnicos (6,7). Esta prueba tiene carácter complementario y busca establecer el estado de la infección (pasada o actual), para que, posteriormente, el banco de sangre adelante las acciones de su responsabilidad, como la asesoría al donante, la correspondiente remisión a la aseguradora en salud y la notificación a la Red de Bancos de Sangre.

Se hizo un análisis univariado en el que se determinaron las frecuencias absoluta y relativa de cada una de las variables categóricas. La serorreacción general contra *T. pallidum* y la prevalencia de sífilis, se calcularon con base en los resultados de las pruebas treponémica y no treponémica correspondientemente, posteriormente fueron estratificadas según las variables sociodemográficas. Se utilizó la prueba de ji al cuadrado de Pearson para

evaluar las diferencias entre las proporciones, así como la tendencia lineal. Los intervalos de confianza para las proporciones se calcularon con el método de puntuación de Wilson sin corrección de continuidad (15).

Los datos se analizaron utilizando Microsoft Excel™, versión 2016 (Microsoft Corporation, Mountain View, CA, USA). Con el fin de visualizar la distribución geográfica de los casos serorreactivos y prevalentes, se utilizó Google Maps™ (Google Inc., Mountain View, CA, USA). Los donantes se agruparon geográficamente según la dirección de residencia registrada en el cuestionario previo a la donación. La referencia geográfica de las direcciones de los donantes con residencia en las diferentes localidades de la ciudad se determinó según la división política: Murillo Suroccidente, Metropolitana, Murillo Suroriente, Norte-Centro Histórico y Riomar.

El estudio se ajustó a los principios éticos de la Declaración de Helsinki y la Resolución 8430 del Ministerio de Salud de 1993, según la cual, el estudio no entrañaba ningún riesgo, ya que se emplearon métodos de investigación documental retrospectiva y no hubo ninguna intervención ni modificación intencionada de las variables en los sujetos que participaron en él.

En todos los casos, se garantizó la confidencialidad de la información, la cual se recolectó de forma anónima, y los resultados se trataron de manera general, no de forma particular, protegiendo la identidad de los participantes en el estudio. Para tal fin, cada uno de los investigadores firmó un acuerdo de confidencialidad de la información (16,17).

Resultados

Durante el periodo de este estudio, se analizaron 37.044 registros de donantes de sangre. La mayoría de estas donaciones provenía de hombres (77,5 %); el grupo etario que más hizo donaciones fue el de 29 a 38 años de edad (25,5 %). La mayoría de los donantes eran empleados, 61,7 % vivía en pareja, 63,4 % pertenecía al régimen contributivo y el 92% al subsidiado y el 62 % residía en la ciudad de Barranquilla y el 29,2 % en municipios de su área metropolitana. La mayoría de las donaciones (81,5 %) en Barranquilla provenía de personas residentes en las localidades ubicadas en el sur de la ciudad: Murillo Suroriente, Murillo Suroccidente y Metropolitana (cuadro 1).

En el cuadro 2 se presentan los resultados de la serorreacción y la prevalencia para sífilis en la población de estudio según las variables analizadas. Se encontró que 18,6 (IC_{95%} 17,3-20,1) de cada mil donantes eran reactivos en la prueba treponémica, en tanto que 9,3 (IC_{95%} 8,3-10,3) de cada mil eran positivos en la prueba no treponémica, es decir, tenían una infección activa.

En ambos grupos, los hombres registraron una serorreacción y una prevalencia superiores a las de las mujeres, y en el grupo con prueba treponémica reactiva, se observó que esta aumentó con la edad. En el grupo de infección activa, la mayor prevalencia se encontró en los mayores de 60 años. Con respecto al estado civil, la ocupación y los municipios de residencia, la serorreacción y las prevalencias más altas se encontraron en los viudos, desempleados y residentes en municipios del departamento del Atlántico diferentes de Barranquilla y su área metropolitana. Lo mismo se encontró en el área metropolitana, en Murillo Suroriente y en Murillo Suroccidente en Barranquilla (figura 1). Se encontró una asociación significativa entre la sífilis y las variables de sexo y ocupación. En cuanto a la relación con la edad, esta solo fue significativa en las infecciones previas (cuadro 2).

Cuadro 1. Características sociodemográficas de la población de estudio

Variables	Donantes (n=37.044)	
	n	%
Sexo		
Mujer	8.335	22,5
Hombre	28.709	77,5
Estado civil		
Casado	12.373	33,4
Divorciado	556	1,5
Soltero	12.928	34,9
Unión libre	11.113	30
Viudo	74	0,2
Régimen de seguridad en salud		
Contributivo	18.337	49,5
Subsidiado	15.744	42,5
Especial	1.259	3,4
No afiliado	1.704	4,6
Ocupación		
Empleado	22.856	61,7
Trabajador independiente	6.631	17,9
Desempleado	852	2,3
Hogar	3.445	9,3
Estudiante	3.149	8,5
Pensionado	111	0,3
Municipio de residencia		
Barranquilla	22.973	62
Área metropolitana	10.809	29,2
Soledad	8.088	21,8
Galapa	603	1,6
Malambo	1.396	3,8
Puerto Colombia	722	1,9
Resto de municipios	3.262	8,8
Localidad*		
Murillo Suroccidente	7.060	30,7
Murillo Suroriente	7.088	30,9
Norte-centro histórico	2.620	11,4
Riomar	1.627	7,1
Área metropolitana	4.578	19,9

*Solo para la ciudad de Barranquilla

Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio representan el primer reporte sobre serorreacción y seroprevalencia de la sífilis en donantes a partir de la información obtenida en un banco de sangre en el departamento del Atlántico. Se encontró una serorreacción de 1,86 %, mayor que el promedio nacional (1,37 %) reportado durante 2015 y 2016 en los informes anuales de la Red Nacional de Bancos de Sangre (14), así como del reportado por otros bancos de sangre en Colombia (1,2 %) (18). Asimismo, se encontró una prevalencia de 0,93 %, inferior a las reportadas en estudios en otros países, como Venezuela (1,3 %) (Benítez J, Rodríguez-Morales AJ. Seroprevalence of blood-borne infections among blood donors in Venezuela, 2001-2002. In: 13th International Congress on Infectious Diseases. Abstracts, poster presentations, 2008. p. 12) y Nigeria (1,1 %) (19), pero superior a la reportada en India (0,28 %) (20).

La serorreacción registrada en este estudio es inferior al promedio reportado por el Instituto Nacional de Salud para el departamento del Atlántico en el mismo periodo (2,17 %), lo que resalta la importancia de hacer esta prueba para garantizar la seguridad de la transfusión (10,21).

Cuadro 2. Serorreacción y seroprevalencia de sífilis en la población de estudio según las variables sociodemográficas

Categoría	Contacto previo con <i>T. pallidum</i> (prueba treponémica reactiva)		Infección activa con <i>T. pallidum</i> (prueba no treponémica positiva)		
	Serorreacción por 1.000 (IC ₉₅ %)	OR (IC ₉₅ %)	Prevalencia por 1.000 (IC ₉₅ %)	OR (IC ₉₅ %)	
General	18,6 (17,3-20,1)	-	9,3 (8,3-10,3)	-	
Sexo					
Mujer	14,6 (12,4-17,6)	1,0	6,8 (5,3-8,8)	1,0	
Hombre	19,8 (18,1-21,3)	1,3 (1,1-1,6) p= <0,01	10,0 (8,9-11,2)	1,4 (1,1-1,9) p= 0,01	
Edad (años)					
19-28	13,6 (11,3-16,3)	1,0	8,0 (6,3-10,2)	1,0	
29-38	16,0 (13,6-18,7)	1,2 (0,9-1,5)	9,5 (7,8-11,7)	1,2 (0,9-1,6)	
39-49	18,4 (15,7-21,5)	1,4 (1,1-1,7)	9,4 (7,5-11,7)	1,2 (0,8-1,6)	
50-59	24,2 (21,1-27,7)	1,8 (1,4-2,3)	9,2 (7,4-11,5)	1,1 (0,8-1,6)	
60+	25,1 (19,8-31,8)	1,9 (1,4-2,5) *p-tend=<0,01	12,0 (8,5-16,9)	1,5 (0,9-2,3) *p-tend=0,17	
Estado civil					
Casado	20,1 (17,8-22,8)	1,0	8,8 (7,3-10,6)	1,0	
Divorciado	23,4 (13,7-39,6)	1,2 (0,6-2,0)	7,2 (2,8-18,4)	0,8 (0,3-2,2)	
Soltero	16,0 (14,0-18,3)	0,8 (0,6-0,9)	9,7 (8,1-11,5)	1,1 (0,8-1,4)	
Unión libre	19,3 (16,9-22,1)	0,9 (0,8-1,1)	9,3 (7,6-11,2)	1,0 (0,8-1,4)	
Viudo	27,0 (7,4-93,3)	1,3 (0,3-5,5) p=0,104	27,0 (7,4-93,3)	3,1 (0,7-12,9) p=0,506	
Régimen de seguridad en salud					
Contributivo	17,1 (15,3-19,0)		8,0 (6,8-9,4)		
Subsidiado	20,1 (18,0-22,4)		10,5 (9,1-12,3)		
Especial	16,7 (10,9-25,4)		4,8 (2,2-10,4)		
No afiliado	20,5 (14,8-28,4)		13,5 (9,0-20,2)		
Ocupación					
Estudiante	11,1 (8,0-15,4)	1,0	7,0 (4,6-10,6)	1,0	
Desempleado	27,0 (18,1-4,0)	2,5 (1,4-4,2)	20,0 (12,5-31,7)	2,9 (1,5-5,5)	
Empleado	18,2 (16,5-20,0)	1,6 (1,2-2,3)	8,9 (7,7-10,2)	1,3 (0,8-1,9)	
Trabajador independiente	21,6 (18,3-25,3)	1,9 (1,3-2,8)	9,8 (7,7-12,5)	1,4 (0,9-2,3)	
Hogar	19,7 (15,6-24,9)	1,8 (1,2-2,7)	10,4 (7,6-14,4)	1,5 (0,9-2,5)	
Pensionado	18,0 (5,0-63,3)	1,6 (0,4-6,8) p=0,005	0,0 (0,0-33,3)	-- p=0,012	
Municipio de residencia					
Barranquilla	15,1 (13,6-16,7)		7,5 (6,5-8,7)		
Área metropolitana	20,4 (17,9-23,3)		10,9 (9,1-13,1)		
Soledad	16,8 (14,2-19,9)		8,8 (7,0-11,1)		
Galapa	28,2 (17,7-44,7)		11,6 (5,6-23,8)		
Malambo	24,4 (17,5-33,8)		12,2 (7,6-19,4)		
Puerto Colombia	47,1 (33,9-65,1)		31,9 (21,3-47,3)		
Resto de municipios	36,5 (30,6-43,5)		15,9 (12,2-20,8)		
Localidad*					
Riomar	8,6 (5,1-14,4)	1,0	4,9 (2,5-9,7)	1,0	
Norte-centro histórico	13,4 (9,6-18,5)	1,5 (0,8-2,9)	4,6 (2,6-8,0)	0,9 (0,4-2,3)	
Murillo Suroccidente	14,7 (12,2-17,8)	1,7 (0,9-3,0)	7,2 (5,5-9,5)	1,5 (0,7-3,1)	
Murillo Suroriental	16,1 (13,4-19,3)	1,8 (1,1-3,3)	8,7 (6,8-11,2)	1,5 (0,7-3,1)	
Área metropolitana	17,3 (13,9-21,5)	2,0 (1,1-3,6) p=0,13	8,7 (6,4-11,9)	3,2 (1,5-6,9) p=0,14	

OR: Odds ratio; IC: índice de confianza

* Prueba de ji al cuadrado para la tendencia lineal. Un resultado significativo sugiere que la pendiente de la línea de tendencia es distinta de cero.

Los resultados evidenciaron una mayor serorreacción y prevalencia de la infección en hombres que en mujeres, lo que concuerda con lo reportado para el país (9,10). La asociación con estas variables fue significativa: los hombres tenían 1,3 veces mayores probabilidades de presentar una prueba treponémica reactiva y 1,4 veces mayor probabilidad de presentar una



Figura 1. Distribución de casos serorreactivos y seropositivos para sífilis en el distrito de Barranquilla y municipios del área metropolitana, 2015 y 2016

prueba no treponémica positiva, en comparación con las mujeres. En otros estudios en los que se han reportado mayores prevalencias de la infección en hombres, no se han encontrado diferencias estadísticas significativas entre sexos en la seroprevalencia (22).

En cuanto a la edad, se encontró que la reacción de la prueba treponémica fue significativamente mayor ($p < 0,01$), en comparación con la positividad de la prueba no treponémica, en todos los grupos etarios. Asimismo, se evidenció que la serorreacción en la prueba treponémica aumentaba con la edad, lo cual puede deberse al aumento de la probabilidad de exponerse a *T. pallidum* al aumentar la edad. Esto también se ha reportado en otros estudios en Colombia, en los que se ha identificado que tener más de 35 años es un factor de riesgo para contraer la sífilis (23). La ocupación también tuvo una asociación significativa con la infección, al observarse que las personas desempleadas presentaban la serorreacción y las prevalencias más altas, lo que estaría relacionado con un sesgo de información por parte de los donantes, quienes podrían omitir datos intencionalmente.

Con respecto al municipio de residencia, las cifras de serorreacción y prevalencia observadas en el área metropolitana superaron a las observadas en Barranquilla. En Puerto Colombia, se registró la mayor serorreacción y prevalencia entre los municipios del área metropolitana, en tanto que, en Soledad, se registraron las menores. En Barranquilla, las localidades Metropolitana y Murillo Suroriente no solo presentaron la serorreacción y las prevalencias más altas, sino que, comparadas con la localidad de Riomar (localizada al norte de la ciudad), sus habitantes tendrían mayor probabilidad de presentar la infección en el transcurso de su vida; sin embargo, no se puede decir que en estas localidades se presente mayor o menor riesgo de presentar una infección activa.

En cuanto a sus limitaciones, en el estudio no se evaluó la asociación entre la infección y otras variables, como tener muchas parejas sexuales, tener relaciones sexuales con personas del mismo sexo, intercambio de dinero por sexo o consumo de sustancias psicoactivas, los cuales son comportamientos de riesgo asociados con la infección en estudios previos (24-27).

Este tipo de estudios puede ayudar a entender la dinámica de la transmisión de la sífilis en un lugar determinado, ya que la población analizada está dentro de

un rango de edad específico (18 a 65 años) y se consideraba sana o asintomática como consecuencia del proceso de selección de donantes mediante encuestas y entrevistas privadas, en concordancia con los parámetros establecidos en las normas. En futuros estudios, sería importante incluir otros bancos de sangre de Barranquilla, para tener información más precisa sobre la seroprevalencia de la sífilis en donantes de sangre en el departamento de Atlántico.

Los resultados obtenidos en el presente estudio pueden servir de línea de base para el desarrollo de otros estudios poblacionales sobre la sífilis en esta región del Caribe colombiano, como contribución al fortalecimiento de estrategias para interrumpir o prevenir la transmisión de *T. pallidum* en la población.

En conclusión, se reportan aquí la serorreacción y la seroprevalencia de sífilis en donantes que acudieron a uno de los principales bancos de sangre del departamento del Atlántico. La serorreacción fue alta comparada con el promedio nacional. Se encontró que el sexo masculino, el aumento de la edad y el desempleo, tuvieron una mayor probabilidad de asociarse con resultados reactivos en las pruebas treponémicas, en tanto que, en las pruebas no treponémicas, solo el sexo masculino y el desempleo se asociaron con una mayor probabilidad. En otras palabras, se encontró una asociación entre la sífilis, y las variables sociodemográficas de sexo y ocupación.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Infecciones de transmisión sexual, 2016. Fecha de consulta: 18 de octubre de 2017. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/es/>
2. Galban E, Benzaken A. Situación de la sífilis en 20 países de Latinoamérica y el Caribe: año 2006. J Bras Doenças Sex Transm. 2006;19:166-72.
3. Blejer J, Carreras-Vescio L, Salamone H. Riesgo de transmisión de infecciones por vía transfusional. Medicina (B. Aires). 2002;62:259-78.
4. Ministerio de Salud Pública. Resolución 901 - Marzo 20 de 1996. p. 40. Fecha de consulta: 2 de julio de 2018. Disponible en: <https://www.invima.gov.co/resoluciones-bancos-de-sangre/171-resolucion-901-marzo-20-de-1996.html>
5. Presidencia de la República de Colombia. Decreto 1571 - Agosto 12 de 1993. p. 37. Fecha de consulta: 2 de julio de 2018. Disponible en: <https://www.invima.gov.co/decretos-reactivos-de-diagnostico-in-vitro/437-decreto-1571-agosto-12-de-1993.html>
6. Instituto Nacional de Salud. Circular No. 0082 de 2011. Anexo técnico 1. 2011. Fecha de consulta: 4 de julio de 2018. Disponible en: https://www.invima.gov.co/images/pdf/normatividad/bancos-sangre/anexo_tecnico_082.pdf
7. Instituto Nacional de Salud. Circular No. 0082 de 2011. Anexo técnico 2. 2011. Fecha de consulta: 4 de julio de 2018. Disponible en: <http://studylib.es/doc/8276672/circular-082-de-2014.-anexo-t%C3%A9cnico-2>
8. Red Nacional Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión. Informe nacional de indicadores. 1° de enero a 31 de diciembre de 2012. Fecha de consulta: 9 de julio de 2018. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/ins-informe-anual-red-sangre-2012.pdf>
9. Red Nacional Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión. Informe nacional de indicadores. 1° de enero a 31 de diciembre de 2013. Fecha de consulta: 9 de julio de 2018. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/ins-informe-anual-red-sangre-2013.pdf>
10. Red Nacional Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión. Informe nacional de indicadores. 1° de enero a 31 de diciembre de 2014. Fecha de consulta: 11 de julio de 2018. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/ins-informe-anual-red-sangre-2014.pdf>
11. Red Nacional Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión. Informe nacional de indicadores. 1° de enero a 31 de diciembre de 2015. Fecha de consulta: 11 de julio de 2018. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/ins-informe-anual-red-sangre-2015.pdf>

12. Instituto Nacional de Salud. Informe de gestión, 2016. Fecha de consulta: 11 de julio de 2018. Disponible en: https://www.ins.gov.co/Direcciones/RedesSaludPublica/InformesdeGestion/Informe_de_gesti3n_2016.pdf
13. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. Sífilis gestacional y sífilis congénita. Bogotá; 2015. p. 40. Fecha de consulta: 11 de julio de 2018. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/ProtocolosSIVIGILA/PROSifilisGestacionalyCongenita.pdf>
14. Saab F, Tomaz C. Prevalencia de sífilis en mujeres gestantes atendidas por el Programa de Protección a la Gestante (PPG) y reporte de aborto en el Estado de Sergipe, Brasil. Salud UIS. 2016;48:214-20. <https://doi.org/10.18273/revsal.v48n2-2016006>
15. Newcombe RG. Two-sided confidence intervals for the single proportion: Comparison of seven methods. Stat Med. 1998;17:857-72.
16. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 8430 de 1993. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social; 1993. p. 12.
17. Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Fecha de consulta: 13 de julio de 2018. Disponible en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>
18. Bedoya JA, Cortés-Márquez MM, Cardona-Arias JA. Seroprevalencia de marcadores de infecciones transmisibles por vía transfusional en banco de sangre de Colombia. Rev Saúde Pública. 2012;46:950-9. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102012000600004>
19. Buseri FI, Okonkwo CN. Population-based survey of HIV sero-status and vertical transmission among naive pregnant women in Sokoto, Nigeria. Asian J Med Sci. 2015;6:49-57. <https://doi.org/10.3126/ajms.v6i3.11530>
20. Pallavi P, Ganesh CK, Jayashree K, Manjunath GV. Seroprevalence and trends in transfusion transmitted infections among blood donors in a university hospital blood bank: A 5 year study. Indian J Hematol Blood Transfus. 2011;27:1-6. <https://doi.org/10.1007/s12288-010-0047-x>
21. Dirección de Redes en Salud Pública. Informe de gestión 2016. Bogotá: INS; 2016. Fecha de consulta: 13 de julio de 2018. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/Direcciones/RedesSaludPublica/InformesdeGestion/Informe%20de%20gesti3n%20de%202016.pdf>
22. Noubiap JJ, Joko WY, Nansseu JR, Tene UG, Siaka C. Sero-epidemiology of human immunodeficiency virus, hepatitis B and C viruses, and syphilis infections among first-time blood donors in Edéa, Cameroon. Int J Infect Dis. 2013;17:e832-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.12.007>
23. Rave-Zuluaga DY, Rend3n-Castrill3n LE, Calvo Betancur VD. Donante voluntario y de reposici3n sero-reactividad en el municipio de Rionegro, Antioquia. Universidad y Salud. 2011;13:43-9.
24. Zhou C, Rou K, Dong WM, Wang Y, Dong W, Zhou Y, *et al*. High prevalence of HIV and syphilis and associated factors among low-fee female sex workers in mainland China: A cross-sectional study. BMC Infect Dis. 2014;14:225. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-225>
25. Motta A, Marín DP, Merlo E. Prevalencia de herpes, sífilis y condilomatosis en pacientes con VIH en un hospital de referencia de Bogotá. Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica. 2013;21:321-7.
26. Solomon MM, Mayer KH, Glidden DV, Liu AY, McMahan VM, Guanira J V, *et al*. Syphilis predicts HIV incidence among men and transgender women who have sex with men in a preexposure prophylaxis trial. Clin Infect Dis. 2014;59:1020-6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu450>
27. Park SY, Kang JH, Roh JH, Huh HJ, Yeo JS, Kim DY. Secondary syphilis presenting as a generalized lymphadenopathy. Sex Transm Dis. 2013;40:490-2. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e3182897eb0>

Historical review

Francisco Campos-Rivadeneira and Roberto Levi-Castillo: Their lives and contributions to the study of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Ecuador

Giovani Marcelo Ramón^{1,2}, Rodolfo Pérez³, Pablo Jarrín⁴

¹ Museo de Zoología, Instituto de Zoología Terrestre, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador

² Instituto Biosfera, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador

³ Academia Nacional de Historia del Ecuador, Quito, Ecuador

⁴ Universidad Regional Amazónica Ikiam, Tena, Ecuador

The study of mosquitoes is important in the prevention of vector-borne diseases. In Ecuador, the study of local mosquito biodiversity was pioneered by two entomologists whose contributions span through the first half of the 20th century, Francisco Campos-Rivadeneira and Roberto Levi-Castillo.

Both of them contributed to general aspects of Entomology and to particular insights in mosquito taxonomy. Their publications and discoveries were recognized by the international scientific community but went unnoticed in South America during their time. Today, very few citizens remember the names and contributions of these two scientists.

Here, we provide an overview of their lives, a summary of their contributions, and we conclude with a broader outlook on the practice of science in Latin America during their time.

Keywords: Culicidae/classification; disease vectors; entomology/history; Ecuador.

Francisco Campos-Rivadeneira y Roberto Levi-Castillo: sus vidas y contribuciones al estudio de los mosquitos (Diptera: Culicidae) en Ecuador

El estudio de los mosquitos es una importante tarea en la prevención de las enfermedades transmitidas por vectores. En Ecuador, el conocimiento de la biodiversidad local de mosquitos se inició con dos entomólogos pioneros que trabajaron a inicios del siglo XX: Francisco Campos-Rivadeneira y Roberto Levi-Castillo.

Ambos hicieron importantes contribuciones en el campo de la Entomología en general y de la taxonomía de los mosquitos en particular. En su época, sus aportes fueron reconocidos por la comunidad científica internacional, pero pasaron desapercibidos en la región suramericana. Hoy en día, son muy pocos los que recuerdan los nombres y los aportes de estos dos hombres de ciencia.

En este artículo, se presenta una breve biografía de ambos científicos y un resumen de sus contribuciones, y se establece en perspectiva la situación de la práctica de la ciencia en Latinoamérica durante la época.

Palabras clave: Culicidae/clasificación; vectores de enfermedades; entomología/historia; Ecuador.

The study of mosquito populations and their distribution is an important component in the prevention of vector-borne diseases. This is particularly important nowadays given the increasing frequency of mosquito-transmitted diseases and the emergence of new arboviruses (for example, chikungunya, Zika) (1-5).

The seminal contributions of Roberto Levi-Castillo and Francisco Campos-Rivadeneira (Levi-Castillo R. Provisional List of the Culicidae, Simuliidae, Phlebotomus, and Culicoides of Ecuador. Proceedings, Tenth International Congress of Entomology, Montreal, August 17-25, 1956. Section on Medical and Veterinary Entomology. 1958, Vol. 3, p. 867-71) (6-8) remained isolated and inactive in the timeline of mosquito vector research in Ecuador for an extended period. The study of mosquitoes in Ecuador has regained attention with both ecological (9-15) and taxonomic studies (16-19) only recently.

The current estimated number of mosquito (Diptera: Culicidae) species in Ecuador is 244 (12,17,20-22). However, this estimate is expected to increase

Received: 22/03/18
Accepted: 17/09/18
Published: 24/09/18

Citation:

Ramón GM, Pérez R, Jarrín P. Francisco Campos-Rivadeneira and Roberto Levi-Castillo: Their lives and contributions to the study of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Ecuador. *Biomédica*. 2019;39(Supl.1):172-98
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4415>

Corresponding author:

Giovani Marcelo Ramón. Avenida Interocéánica, Quito, Ecuador
Telephone number: (593) 2297 1700, extension 1383; (593) 9 9564 5860
gramonc@gmail.com and gramonc@usfq.edu.ec

Author contributions:

Giovani Marcelo Ramón: writing of the introduction, translation of the biographies to the English language, compilation of the bibliographical information, and writing of the section describing the contributions of Campos-Rivadeneira and Levi-Castillo.
Rodolfo Pérez: compilation of all the biographical information and writing of the original texts in Spanish.
Pablo Jarrín: writing of the final section on the practice of science in Latin America during the first half of the 20th century and grammatical corrections to the manuscript

Funding:

The authors declare not to have received direct funding for the elaboration of this manuscript.

Conflict of interest:

The authors declare no conflicts of interest.

in the next few years given the sustained efforts of local researchers to explore the ample diversity of habitats and complex geography of Ecuador (23,24). This process of discovery will be accelerated by the availability of new molecular methods that allow differentiating what once were cryptic and unknown mosquito species (18,25,26).

Both entomologists, Francisco Campos-Rivadeneira (figure 1A) and Roberto Levi-Castillo (figure 1B), were born in the port city of Guayaquil and they pioneered the study of mosquito vectors and established the seeds for the development of Medical Entomology in Ecuador during the 20th century (8). Although the works of these pioneering entomologists have been acknowledged to some extent in a handful of publications (8,12), no complete assessment has been made on the scientific efforts and contributions of these two Ecuadorian scientists, especially in regards to our understanding of mosquito biodiversity and taxonomy.

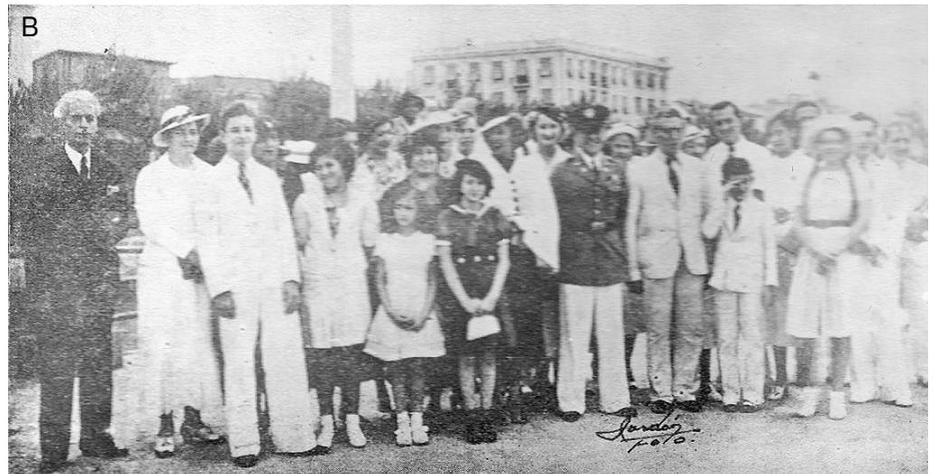


Figure 1. A. Portrait of Francisco Campos-Rivadeneira in 1935

Reproduction authorized by: Archivo Histórico Camilo Destrüge, Biblioteca Municipal de Guayaquil, Instituto Nacional de Patrimonio Cultural del Ecuador).

B. Picture of a young Roberto Levi-Castillo (third from the left) in Guayaquil after his arrival from the United States in 1938.

Reproduction authorized by: Archivo Histórico del Ministerio de Cultura y Patrimonio del Ecuador

Here we provide a biography and historical assessment on the lives of these two Ecuadorian scientists and we provide a comprehensive list of the scientific literature regarding their entomological studies, in particular, their contributions to the study of mosquitoes in Ecuador. We believe the lives of both Ecuadorian entomologists can serve as a case study on the cultural and economic conditions in Ecuador and other countries in South America, which throughout the 20th century experienced a unique and difficult history for the development of science. The system proposed by Reinert (27) for abbreviations of mosquito generic-level taxa is used throughout the text.

Francisco Campos-Rivadeneira

Campos-Rivadeneira was born in Guayaquil, in the province of Guayas (coastal Ecuador), on January 11th, 1879. His father was Francisco Campos Coello and his mother Manuela Rivadeneira Olvera. He grew up in a catholic and traditional family along with six other siblings and he never completed high school (28,29). His father's family had a long tradition of intellectuals,

which included physicians, bibliographers, and antiquarians. His father was an outstanding humanist and thinker of his time, who held important academic and political positions throughout his life, including director of the *Biblioteca Municipal* in Guayaquil, secretary of the *Banco Nacional*, head of Guayaquil's most important high school, minister of Education, professor, journalist, and politician (30).

From an early age and encouraged by his father, Campos-Rivadeneira developed a strong interest in the natural world. He and his father used to take long excursions through Guayaquil and its rural outskirts, where they would look for all kinds of animals, particularly insects. Given his shy and introverted personality, a young Campos-Rivadeneira spent most of his time collecting insects and learning from books. Having left aside formal instruction, his love for insects drove him to acquire knowledge on the principles of Entomology and other scientific disciplines. Given the social limitations of his time and society, Campos-Rivadeneira self-taught scientific mastery on Entomology was remarkable. At only 16 years of age, he was hired to teach geography at the *Colegio Nacional Vicente Rocafuerte* (28,29). He also received instruction from the Jesuit priest Luis Sodiro, who was a renowned botanist, and from whom Campos-Rivadeneira probably acquired much of his curiosity for nature (31).

In 1895, after the liberal revolution in Ecuador (32), his father was given the position of principal at the *Colegio San Vicente del Guayas*. From this new position, his father established the *Museo de Ciencias Naturales* and bought a collection of zoological, botanical, and mineralogical specimens from France. Endorsed by his father, Campos-Rivadeneira was soon appointed as museum director. This academic position may have given Campos-Rivadeneira an adequate environment to further his interests in the study of insects and allowed him to house his private collections into the museum he directed, which included beetles and a large variety of metals and precious stones. In 1899, he started editing a "Guía rápida del museo" which included information on insects. He wished to share the love and admiration he had for the local fauna with the citizens of Guayaquil (29).

In 1900, after publishing an article on Ecuadorian entomology, he was invited to the Latin American Scientific Conference in Buenos Aires. Tragically, a year later the museum collections under his aegis were destroyed in a fire that burned to ashes most of the *Colegio Nacional Vicente Rocafuerte*. Despite this setback, Campos-Rivadeneira continued making expeditions and publishing the results of his findings. Considering his efforts to elevate national science, president Lizardo García awarded him the title of "*Zoólogo del Estado*". The museum was re-opened after a year of inactivity following the fire (28,29).

In 1902, he was appointed as professor of Natural Sciences and lectured on the subject of Hygiene at the *Facultad de Medicina* of the *Universidad de Guayaquil*. He was a kind and inspiring professor who soon became popular among his students, especially during the entomological expeditions that he liked to share with his pupils. His publications on Entomology started to appear more frequently on local magazines, which remain as historical proof of his expertise on a wide range of entomological groups (for example, butterflies, crickets, and beetles) and fields in the natural sciences (taxonomy, morphology, and behavior, among others). In 1907, his sustained contributions to Ecuadorian entomology granted him a membership to the Entomological Society of Cornell, Pennsylvania (28).

From 1907 onwards, most of his studies focused on agricultural pests and in 1917, he was recognized as a member of the Entomological Society of America. In 1920, his interest on medical entomology strengthened and he edited a book entitled “Entomología médica: nuestras principales especies de mosquitos y el modo de extinguirlas”. This book is considered a pioneering effort to inform the local population of Ecuador about the risks of malaria and its vectors. This was followed by a publication on the mosquito fauna of Guayaquil and its surroundings (7). In 1926, he was visited by Emilio J. Pampana, a physician from the Royal College of Physicians and Surgeons of London, with whom he edited a paperback on the anti-malaria campaign in Guayaquil. In 1940, due to his scientific trajectory and productivity, he was appointed Chief of the *Servicio Entomológico* at the *Instituto Nacional de Higiene* (currently known as *Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Leopoldo Izquieta Pérez*), a position that he held until the last days of his life (28,29).

Campos-Rivadeneira had a prolific career and collaborated with many foreign researchers in the field of Entomology. His network of collaborators is exemplified on the many taxa that have been named after him, such as the genus *Camposiana* Townsend 1915 (Diptera: Tachinidae), *Camposiella* Hebard 1924 (Orthoptera: Tettigoniidae), and *Campostrecha* Mello Leitão 1937 (Arachnida: Ammostrechidae), a species of water strider, *Hebrus camposi* (Hemiptera: Hebridae) (33), as well as many species of tiger beetles (34,35). Most of his articles were published in the *Revista del Colegio Nacional Vicente Rocafuerte* (36,37).

The prints of this magazine are few and rare nowadays, held only in a few century-old universities in Ecuador and the central archives of the Ecuadorian government. In an enjoyable quirk of history, Campos-Rivadeneira wrote an article on *Morpho* butterflies in 1946, which was subject to severe criticism from a young and yet unknown Roberto Levi-Castillo.

Despite having been a prolific researcher subject to numerous recognitions and honors, his salary never reflected his achievements and his life was marked by poverty. After the widespread introduction of DDT as a generic pesticide to control insect populations, he was convinced that his work on agricultural entomology was not relevant anymore. This led to a period of self-inflicted isolation and confinement within the walls of his museum collection, which at that time was housed at the *Instituto Nacional de Higiene*.

Campos-Rivadeneira passed away on May 5th, 1962. During his career, he described approximately 150 species of insects that were previously unknown to science. After his death, his beloved museum collection was neglected and eventually lost (28,29). Ten years after his death, a group of biologists and scholars in Quito founded the *Sociedad de Amigos de la Naturaleza Francisco Campos*. This Society promoted the research and conservation of Ecuador's biodiversity and many relevant researchers at the time became members. In 1992, the Congress of Ecuador condecorated the Society for its contributions and also for helping to establish the *Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales* and the *Fundación Natura* (J. M. Carrión, personal communication).

Roberto Levi-Castillo

Levi-Castillo was born in Guayaquil on January 29th, 1921. Resembling Campos-Rivadeneira, Levi-Castillo's family was also part of a legacy of intellectuals and artists. His father was Roberto Levi Hoffman, who during the 19th century attended his postgraduate studies under the guidance of Robert

Koch and Paul Ehrlich. Levi Hoffman arrived in Ecuador in 1909 to work as the chief chemist for the Guayaquil laboratory and throughout the years became an influential person in many affairs related to the social, political, and commercial life of this city.

Levi-Castillo initiated his basic studies at a local school but was soon sent by his family to continue them in Europe. As a teenager, his father enrolled him at the Riverside Military Academy in Gainesville, GA, and he later moved to the Hollywood Military Academy in Pensacola, FL. He graduated in 1937 as a U.S. Army Air Force Reserve Second Lieutenant. He returned to Ecuador in 1938, and to obtain a locally recognized bachelor title, he completed an additional year of studies at the *Colegio Nacional Vicente Rocafuerte*. Soon after his return to Guayaquil, he was appointed as *ad honorem* instructor at the *Escuela de Aviación Militar* (38).

After finishing high school, he enrolled at the *Universidad de Guayaquil* and studied two simultaneous degrees: In chemistry and pharmaceuticals and in medicine. With the start of the international tensions that led to World War II, he was called by the military to enroll as an army reserve officer. During the Ecuador-Perú war of 1941, he was garrisoned at a military base in the province of El Oro, where he took part in war actions. At some point during this armed conflict, he and two other cadets deserted and traveled to the Andean city of Cuenca. There, he had an emergency surgery due to a tooth infection which was further aggravated by a piece of gauze that was not removed. A severe infection required him to travel back to Guayaquil in sought of better medical treatment but was left with a cavity in his palate that required him to travel to the United States to receive proper treatment (38).

Perhaps taking advantage of his unplanned return to the United States, in 1942 he continued to study at Cornell Medical College. In 1943, he visited the *Escuela de Medicina Tropical* at the *Universidad de La Habana* in Cuba for an eight-month period. Once finished his training in Cuba, he returned to Cornell and received instruction as a US Army Special Forces Officer under the leadership of Major William Barby (who was a decorated World War II war hero). That same year, he was assigned to missions in the allied countries and Italy. His tour of duty included Dundee (Scotland), North Africa, Sicily, Naples, and Anzio, where he helped to combat typhus fever outbreaks as a medical officer. Having an active role in the Sanitary Corps, he also went to Greece and Provence (France) to help control malaria outbreaks (38).

In 1944, he traveled to Fort Leavenworth, Kansas, to attend a Higher Command and Staff Course. Later that year, he returned to Guayaquil where he continued his studies at the *Escuela de Química y Farmacia*. He had an active role in many strikes against the *Concejo Universitario* to demand the upgrade of the School to the status of Faculty. During this time he also collaborated with Francisco Campos-Rivadeneira, with whom he took part in many excursions near Guayaquil city. As a result of this collaboration, he published several papers on the taxonomy of *Anopheles* (39-41). Then, in 1945, he set up the collaboration with the Public Health Inter-American Cooperative Service of the US government and moved to Quito where he worked as an epidemiologist and medical entomologist under Jaime Rivadeneira Dávila. During 1945, he published several important papers on the malaria vectors of the Ecuadorian Andean valleys (42,43), a region where the disease was endemic at that time, but where it was later eradicated (44). In regards to his pioneering findings on the biology of *Anopheles pseudopunctipennis*, the primary vector species at the

highlands of Ecuador at that time, he would remark, “My findings were widely discussed by foreign scientists, meanwhile, here in Ecuador people call me ‘Doctor Mosquito’ and make fun of me” (38).

Later, in 1946, he married a Dominican woman called Martina Bello Germán (38) and moved back to Guayaquil where he started his own research center at the now traditional “El Paraíso” neighborhood. His publications were greatly appreciated by the international scientific community due to the thoroughness of his analyses. He complemented his taxonomical and zoological descriptions with scientific illustrations and microphotographs taken with his camera, which he retrofitted to his microscope. He was fluent in Spanish, English, German, French, and Italian.

In 1947, he was appointed as a chemistry teacher at the *Colegio Nacional Vicente Rocafuerte*. This was a time during which he exchanged correspondence and maintained a healthy scientific controversy with the renowned Francisco Campos-Rivadeneira. His relationship with Campos-Rivadeneira was one of respect and cooperation. Moreover, Levi-Castillo acknowledged him as his mentor and a renowned entomologist (39). In 1949, he published two important scientific papers summarizing what was currently known at the time about South American malaria vectors, including his own original findings (45,46), and also a preliminary list of *Culex* mosquito species from Ecuador (47). During the early 1950s, he published several papers on the mosquito fauna responsible for the transmission of yellow fever in Ecuador and South America (48-52). In December of 1951, he received a doctorate title in Chemistry and Pharmaceutics. His thesis research was an analysis of the resistance of *Culex quinquefasciatus* to insecticides. He would later publish his results in a local journal (53).

In 1952, he was appointed as editor in chief of the *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología*. He also received the international “Carlos Finlay” medal, granted by the *Sociedad Cubana de Medicina Tropical*. The following ten years would be the most productive of his career, a time during which he traveled through the country collecting and cataloging the mosquito diversity of the Ecuadorian coast, the highlands, the Amazonian region, and the Galápagos Islands. The “Distribution of *Haemagogus* mosquitoes in Ecuador” (54), the description of several new species (55-64), and inventories of the Ecuadorian mosquito fauna are amongst some of its most influential papers (6,47,65-66). Regarding other topics, he researched the possible use of the green algae *Chara fragilis* as a biological control for mosquito larvae (67,68). Nevertheless, he did not find evidence of larvicidal properties. He designed a special box to transport live mosquito larvae and pupae collected from the field (69). He was also a pioneer in the use of male genitalia for the identification of mosquito species (39,70) and was the first to use polyvinyl alcohol to prepare microscope slides of mosquito larvae, pupae, and male genitalia (71). Polyvinyl alcohol provides a superior medium that does not require the previous dehydration of specimens (72).

After divorcing his wife and getting remarried to Blanca Muñoz Aguirre, his promising scientific career ended abruptly in 1962. Disappointed by the lack of scientific interest in his young students and after a university strike that made him realize it would be nearly impossible to form new entomologists, he decided to retire from this field. This fateful decision can be understood and explained through this statement: “I understood that my way of thinking was ahead of the local culture and that entomology could not be the reason of my life any more in a society that doesn’t have the economic resources to finance my diverse

research interests. That is why I left science, sold all my equipment, burned down all my books, and abandoned the thing that brought me so much joy and illusion one day, to give way to other realities and, in search for them, I found in philately a new horizon. Immediately, I dedicated myself fervently to it and managed to gather various collections since I had a considerable fortune" (38).

Among his stamp collections, he held the "Scadta" and the "Panagra", which are some of the most valuable and rare stamp series of Ecuador. In 1960, he won the bronze medal at the Albert Hall International Exposition in London. In the long run, he became highly praised by international philatelic societies and recognized as the owner of the best and most complete collection of Ecuadorian stamps. Between 1959 and 1966, he wrote a weekly column at the "El Telégrafo" newspaper from Guayaquil where he would discuss various topics on philately (73).

In 1970, he made a leap into the study of history by collaborating with the historian Julio Estrada Icaza at the *Archivo Histórico del Guayas*. Soon afterward, his friend, the rear admiral Carlos Monteverde Granados, hired him to work at the *Instituto de Historia Marítima* and published several articles in the Institute's journal. In 1991, he became a member of the *Asociación de Historiadores Ecuatorianos* and in 1997, of the *Academia Nacional de Historia*.

Another important facet of his life was his involvement in Freemasonry, in which he was an active member at the Pythagoras Lodge in Washington, D.C., since 1946. He later enrolled at the Texas, Missouri, Kansas, New York, and Iowa lodges. His association to Freemasonry in Ecuador was through the "Luz de América No. 5" Lodge. His essays on masonry were published at "*Ars Quatuor Coronatorum*" (London), which was an important research journal on the history of Freemasonry.

During the 1990s, he moved with his family to Ecuador's capital city, Quito, where he devoted himself to the investigation of historical subjects. He continued to write columns for national newspapers and the journal of the *Universidad de Guayaquil*. He passed away on October 29th, 2006, at the age of 85. Versatile, self-taught, polyglot, and passionate, his production is scattered in different journals and newspapers of the world.

Conclusions

The contributions of Campos-Rivadeneira and Levi-Castillo to the study of disease-transmitting mosquitoes in Ecuador

During their prolific career, Campos-Rivadeneira and Levi-Castillo reported a total of 158 mosquito species for Ecuador, of which 12 were previously unknown in this country (supplementary material). Given the current estimate of approximately 252 mosquito species present in Ecuador (12,15,17,20,21), both scientists described approximately 63 % of the total mosquito fauna. Considering the rapid pace at which the study of mosquito diversity discovers new species, the contributions of contemporary and future researchers will slowly reduce the considerable bias towards what both Campos-Rivadeneira and Levi-Castillo did for entomology in Ecuador (11,12,14,22). Nevertheless, both remain as the most prolific discoverers of mosquitoes in this country.

Campos-Rivadeneira reported a total of 32 mosquito species in Ecuador, 27 of these as new geographical records locally. Most of his specimens were collected in Guayaquil and its surroundings (Durán, Posorja, El Salado) or from nearby cities like Quevedo or Machala. He reported the presence of

Aedes vexans in the Galápagos Islands. However, this was most likely a misidentification with the only native mosquito species that was known to be present in the archipelago at the time, *Ae. taeniorhynchus* (74). In 1954, Levi-Castillo claimed that *Haemagogus equinus*, previously reported by Campos-Rivadeneira (75), was not present in Ecuador and that most likely was misidentified with *Hg. panarchys* or *Hg. spegazzini* (76).

In 1918, Harrison G. Dyar described *Ae. camposanus* based on specimens from Guayaquil sent by Campos-Rivadeneira (77). However, in 1928, Dyar synonymized *Ae. camposanus* with *Ae. euplocamus* (78) only to be brought back from synonymy by Levi-Castillo (79,80). More recently, Arnell synonymized it again as *Ae. euplocamus* (81) and nowadays it is a synonym of *Ae. scapularis*. In 1925, Dyar described *Culex camposi*, a new species, and named it after Campos-Rivadeneira (82). Nevertheless, Lane categorized it as a variety of *Cx. coronator* (83) only to be recognized later again as a valid species by Bram (84). Throughout his career, Campos-Rivadeneira published at least 52 scientific papers dealing with different insect groups; further searches might reveal additional publications. However, we remain confident that we have included all of his publications dealing with mosquito taxonomy hereby.

Levi-Castillo reported a total of 136 species, of which 99 were new geographical records in Ecuador. His specimens were collected throughout all the Ecuadorian territory, from the highlands to the western and eastern lowlands. Yet, some of his collections require confirmation since for some specimens there is no specific reported locality and no other reference collections exist (*Anopheles peryassui*, *Hg. laecotaeniatus*, *Cx. originator*, etc.). Levi-Castillo described 14 new mosquito species for science with specimens from Ecuador, these are *An. gomezdelatorrei*, *Hg. soperi*, *Cx. babahoyensis*, *Cx. guayasi*, *Cx. quitensis*, *Limatus andinus*, *Li. guayasi*, *Trichoprosopon andinum*, *Tr. cotopaxense*, *Wyeomyia esmeraldasii*, *Wy. aequatoriana*, *Wy. amazonica*, *Toxorhynchites aequatorianus*, and *Uranotaenia equatorianna*. Many of these have not been recorded again since their original description (2).

In 1959, *Tx. aequatoriannus* was listed as *nomen dubium* by Stone (85). While Stone does not give a reason for this change, it was most likely due to his lack of access to inspect type specimens. *Tr. cotopaxense* was originally described as *Tr. cotopaxensis* by Levi-Castillo and was later renamed by Stone (86); then, Zavortink categorized this species as *nomen dubium* advocating that its description seemed to include characteristics from at least three other species and most likely no type specimens exist (87). Other species described by Levi-Castillo were later synonymized by Stone (85); these are *Ae. garciai* (60) (synonym of *Psorophora cingulata*), *Hg. garciai* (88) (synonym of *Hg. boshelli*), *Cx. azuayus* Levi-Castillo, 1954 (61) (synonym of *Cx. nigripalpus*) and *Wy. aequatorialis* Levi-Castillo, 1952 (55) (synonym of *Wy. aphobema*). Levi-Castillo also described two subspecies of *An. anopheles pseudopunctipennis*: *An. Ano. pseudopunctipennis* ssp. *levicastilloi* (1944a) and *An. Ano. pseudopunctipennis* ssp. *rivadeneirai* (1945b) which to the present day are still recognized as valid (20).

Given Levi-Castillo's contributions to dipterology, in 1945, John Lane described *Cx. levicastilloi* from specimens probably sent by Levi-Castillo from Ecuador (89). Interestingly, there is also a mosquito from Madagascar, *Mymomyia (Ingramia) levicastilloi* described by French entomologist Alexis Grjebine (1918-1988) in 1986 (90). Levi-Castillo probably met Grjebine in 1943 during his tour of duty around Europe (see section above).

For the most part, and concurring with the report by Zavortink (87), mosquito specimens of Levi-Castillo that were kept at the *Centro Ecuatoriano de Investigaciones Entomológicas* (CIEI), in Guayaquil seem to have been lost. To our knowledge, the only existing collection by Levi-Castillo seems to be the slides deposited at the U.S. National Entomology Collections (USNM) as reported by Zavortink (87), and some adult types deposited at this same museum (*Cx. babahoyensis* and *Hg. soperi*) (20). The whereabouts of the remaining specimens are currently unknown. It might be possible that his collection at the CIEI suffered a fate similar to that of his books when Levi-Castillo decided to abandon his entomological studies. Throughout his career, Levi-Castillo published a total of 65 papers, and we are confident that we have searched and included if not all, most of his production, particularly that dealing with mosquito taxonomy. Interestingly, both Campos-Rivadeneira and Levi-Castillo published their studies as single authors in the majority of their publications.

A comment on the practice of science in Latin America during the first half of the 20th century

The reasons for the success or failure of both Campos-Rivadeneira and Levi-Castillo as scientists rely on a shared set of characteristics that appropriately represent the cultural and economic conditions that permeated most of the 20th century in Ecuador and that affected how science and technology developed in this country.

Both Campos-Rivadeneira and Levi-Castillo lived at a time when the fate of Latin American countries was determined by an intense focus on the export of unprocessed materials and goods with little added value in knowledge and technology (91,92). As a consequence, the majority of the population in Ecuador remained excluded from the development of new ideas, which reinforced their detachment from scientific inquiry and innovation and, thus, were not agents of societal change (93).

The lives and accomplishments as scientists of both Campos-Rivadeneira and Levi-Castillo share common ground in the fact that both were able to transcend the limitations of their time and society by privileged social and economic conditions. Their families belonged to a favorable combination of strong intellectual traditions, foreign higher education, and auspicious social connections. Even under such unique circumstances, both scientists performed under conditions defined by limited resources, low salaries, inadequate equipment, small libraries, isolation from scientific networks, and political instability (94), which have historically plagued the practice of science in Latin America.

The dependence on foreign education and cultural and professional connections to Europe and North America was also an essential component of the lives and professional careers of these Ecuadorian scientists. Without such foreign influence and support, it would have been nearly impossible for both to accomplish the productivity and notoriety for which they are now remembered at least within the narrow spectrum of Ecuadorian entomologists and historians. The exogenous influence in the contributions to science by Campos-Rivadeneira and Levi-Castillo was also related to how Latin American countries invested in science as an engine for rapid economic development. Contrary to the medical focus that characterized the research of these two scientists, very few success stories are known from Latin American scientists in theoretical and non-applied sciences (95).

It has not been our intention to discuss the lives of these two scientists within a robust philosophical framework on the history of Latin American science, akin to the elaborate discussions in the field such as those of Saldaña (95). Nonetheless, we believe the lives of both Campos-Rivadeneira and Levi-Castillo could be considered as generalized paradigms that represent not only the political and social standards for the practice and development of science during the first half of the 20th century in Ecuador, but also as figures that exemplify the overall conditions for the practice of science throughout most of the Latin American history. We could argue that, until recently, to be a successful scientist in Ecuador and most parts of Latin America, one needed to share similar conditions to the lives of both scientists discussed in this manuscript, including social and political connections enabling the support of government authorities to fund science activities directly connected to economic and productive concerns.

One should also regret the anticlimactic end of the scientific careers of both Campos-Rivadeneira and Levi-Castillo. Despite their sustained efforts to nurture and capitalize their individual scientific interests, they were never able to establish a self-sustained school of thought, through students and pupils who could have kept alive and improve on their contributions. This failure may have been related to the poor record of Ecuadorian higher education institutions, which for the most part of the 20th century subsisted in a system which was 'impossible to explain, to evaluate, nor to defend on grounds of equity, efficiency, quality or its contribution to national development' (96).

The lives of Campos-Rivadeneira and Levi-Castillo are examples of fortitude and perseverance through difficult times, something that has characterized many Latin American scientists. It is through these difficulties and continuous struggle against the adversities of their culture and economies that it is possible to represent at least a particular aspect of the history of science in Latin America.

Acknowledgments

We want to extend our gratitude to our dear colleagues and true friends D. Donoso, A. Barragán, and M. Pinto, whose comments on earlier drafts helped to improve the quality of this manuscript. F. Salazar helped to obtain and digitize many of Campos-Rivadeneira's and Levi-Castillo's antique papers. J. M. Carrión kindly provided detailed information on the *Sociedad de Amigos de la Naturaleza Francisco Campos*.

We would also like to thank the editor and two anonymous reviewers whose suggestions contributed to improving the quality of our paper. The authors would like to dedicate this paper to Professor Giovanni Onore, eminent entomologist and mentor, who continues to inspire generations of Ecuadorian entomologists.

References

1. World Health Organization. A global brief on vector-borne diseases. Geneva: World Health Organization; 2014.
2. Leparc-Goffart I, Nougaiere A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X. Chikungunya in the Americas. *Lancet*. 2014;383:514. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60185-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60185-9)
3. 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>
4. Vasconcelos PFC, Calisher CH. Emergence of human arboviral diseases in the Americas, 2000-2016. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2016;16:295-301. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1952>
5. Cao-Lormeau VM, Musso D. Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet*. 2014;384:1571-2. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61977-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61977-2)

6. Levi-Castillo R. Lista provisional y distribución de los mosquitos Culicinos del Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología*. 1953;1:34-45.
7. Campos FR. Estudios biológicos sobre los mosquitos de Guayaquil y alrededores. *Revista del Colegio Nacional Vicente Rocafuerte*. 1925;7:3-48.
8. Barragán AR, Dangles O, Cárdenas RE, Onore G. The History of Entomology in Ecuador. *Annales de la Société entomologique de France*. 2009;45:410-23.
9. Pinault LL, Hunter FF. Characterization of larval habitats of *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Anopheles punctimacula*, and *Anopheles oswaldoi* s.l. populations in lowland and highland Ecuador. *J Vector Ecol*. 2012;37:124-36. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2012.00209.x>
10. Pinault LL, Hunter FF. Larval habitat associations with human land uses, roads, rivers, and land cover for *Anopheles albimanus*, *A. pseudopunctipennis*, and *A. punctimacula* (Diptera: Culicidae) in Coastal and Highland Ecuador. *Front Physiol*. 2012;3:59. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00059>
11. Pinault LL, Hunter FF. New highland distribution records of multiple *Anopheles* species in the Ecuadorian Andes. *Malar J*. 2011;10:236. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-236>
12. Linton YM, Pecor JE, Porter CH, Mitchell LB, Garzón-Moreno A, Foley DH, *et al*. Mosquitoes of eastern Amazonian Ecuador: Biodiversity, bionomics and barcodes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(Suppl.1):100-9. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130440>
13. Stewart-Ibarra AM, Ryan SJ, Beltrán E, Mejía R, Silva M, Muñoz A. Dengue vector dynamics (*Aedes aegypti*) influenced by climate and social factors in Ecuador: Implications for targeted control. *PLoS One*. 2013;8:e78263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078263>
14. Navarro JC, Enríquez S, Vaca F, Benítez-Ortiz W. A new phytotelm plant, *Crinum moorei* (Asparagales: Amaryllidaceae), for the Americas and its mosquito inhabitant (Diptera: Culicidae) in Ecuador. *Florida Entomol*. 2013;96:1224-7.
15. Navarro JC, Duque PL, Liria J, Enríquez S, Vaca-Moyano F, Salazar JG. A new phytotelm plant for Ecuador *Ananas comosus* L. Merr. (Bromeliaceae) and its *Wyeomyia* species inhabitant (Diptera, Culicidae). *CienciAmérica*. 2018;7:1-15.
16. Navarro JC, Ponce P, Cevallos V. Dos nuevos registros de vectores potenciales de fiebre amarilla selvática y Mayaro para el Ecuador. *Bol Malariol Salud Ambient*. 2013;53:77-81.
17. Navarro JC, Enríquez S, Duque P, Campaña Y, Benítez-Ortiz W. New *Sabethes* (Diptera: Culicidae) species records for Ecuador, from Colonso-Chalupas biological reserve, province of Napo (Amazon). *J Entomol Zool Stud*. 2015;3:169-72.
18. Arregui G, Enríquez S, Benítez-Ortiz W, Navarro JC. Taxonomía molecular de *Anopheles* del Ecuador mediante ADN mitocondrial (Citocromo C Oxidasa I) y optimización por parsimonia máxima. *Boletín Malariol Salud Ambient*. 2015;55:128-36.
19. Navarro JC, Enríquez S, Duque P, Campaña WB. New mosquito species records for Ecuador, from Pululahua volcano (Andes) and Napo province (Amazon). *J Entomol Zool Stud*. 2015;3:392-6.
20. Clark JW, Linton Y-M, Pecor JE, Pecor D, Stoffer J, Motoki M, *et al*. Walter Reed Biosystematics Unit. Fecha de consulta: 16 de marzo de 2016. Disponible en: <http://www.wrbu.org>
21. Heinemann SJ, Belkin JN. Collection records of the project "Mosquitoes of Middle America". 13. South America: Brazil (BRA, BRAP, BRB), Ecuador (ECU), Perú (PER), Chile (CH). *Mosq Syst*. 1979;11:61-118.
22. Navarro JC, Enríquez S, Arrivillaga J, Benítez-Ortiz W. Un nuevo *Aedes* para la Amazonía de Ecuador y actualización taxonómica del género para el país. *Boletín Malariol Salud Ambient*. 2016;56:113-21.
23. Sierra R. Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador continental. Quito: EcoCiencia; 1999. p. 194.
24. Hooghiemstra H, Wijninga VM, Cleef AM. The paleobotanical record of Colombia: Implications for biogeography and biodiversity. *Ann Missouri Bot Gard*. 2006;93:297-325.
25. Foster PG, Bergo ES, Bourke BP, Oliveira TMP, Nagaki SS, Sant'Ana DC, *et al*. Phylogenetic analysis and DNA-based species confirmation in *Anopheles* (Nyssorhynchus). *PLoS One*. 2013;8:e54063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054063>
26. Laurito M, Oliveira TM de, Almiron WR, Sallum MAM, Laurito M, de Oliveira TM, *et al*. COI barcode versus morphological identification of *Culex* (*Culex*) (Diptera: Culicidae)

- species: A case study using samples from Argentina and Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108:110-22. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130457>
27. Reinert JF. List of abbreviations for currently valid generic-level taxa in family Culicidae (Diptera). Eur Mosq Bulletin. 2009;27:68-76.
 28. Pérez-Pimentel R. Francisco Campos-Rivadeneira. Guayaquil: Archivo Biográfico Ecuador; 1994. p. 53-7.
 29. Pino EA. Francisco Campos-Rivadeneira. Enciclopedia del Ecuador. Fecha de consulta: 28 de febrero de 2017. Disponible en: <http://www.encyclopediadeecuador.com/personajes-historicos/francisco-campos-rivadeneira/>
 30. Pérez-Pimentel R. Francisco Campos Coello. Guayaquil: Archivo Biográfico Ecuador; 1994. p. 74-7.
 31. Escuela Politécnica Nacional. Luis Sodiro. Historia del Departamento de Biología de la EPN. 2016. Fecha de consulta: 30 de agosto de 2018. Disponible en: <https://cienciasbiologicas.epn.edu.ec/index.php/galeria-home/historia>
 32. Ayala-Mora E. Historia de la revolución liberal ecuatoriana. Quito: Corporación Editora Nacional-Taller de Estudios Históricos; 1994.
 33. Drake CJ, Chapman HC. New American water striders (Hemiptera). Florida Entomol. 1954;37:151-5.
 34. Campos FR. Los Cicindelidae del Ecuador. Revista chilena de historia natural. 1921;25:448-52.
 35. Campos FR. Estudios sobre la fauna entomológica del Ecuador. III, Coleópteros. Revista del Colegio Nacional Vicente Rocafuerte. 1921;6:26-106.
 36. Campos FR. Estudios sobre la fauna entomologica del Ecuador. IX, Ortopteros. Revista del Colegio Nacional Vicente Rocafuerte. 1923;5:3-43.
 37. Campos FR. Catálogo preliminar de los blátidos (cucarachas) del Ecuador. Revista del Colegio Nacional Vicente Rocafuerte. 1926;8:41-57.
 38. Pérez-Pimentel R. Roberto-Leví Castillo. Guayaquil: Diccionario Biográfico de Ecuador; 1994. p. 189-93.
 39. Levi-Castillo R. Clave para la identificación por los órganos masculinos (Terminalia) de los principales géneros, subgéneros y especies de anofelinos ecuatorianos. Quito: Imprenta de la Universidad de Guayaquil; 1944. p. 14.
 40. Levi-Castillo R. El complejo *pseudopunctipennis* en el Ecuador (Diptera, Culicidae). Guayaquil: Imprenta de la Universidad de Guayaquil; 1944. p.10.
 41. Levi-Castillo R. Estudios sobre los Anofelinos de la región del Milagro. Revista de la Asociación de la Escuela de Ciencias Químicas. 1944;3:1-10.
 42. Levi-Castillo R. *Anopheles pseudopunctipennis* in the Los Chilllos Valley of Ecuador. J Econ Entomol. 1945;38:385-8.
 43. Levi-Castillo R. A new variety of the *Anopheles pseudopunctipennis* complex in Ecuador (Diptera-Culicidae). Mosq News. 1945;5.
 44. Pinault LL, Hunter FF. Malaria in highlands of Ecuador since 1900. Emerg Infect Dis. 2012;18:615-22. <https://doi.org/10.3201/eid1804.111267>
 45. Levi-Castillo R. The vectors of malaria on the Pacific slopes of South America, and their control. Rev Cubana Med Trop Parasitol. 1949;5:101-5.
 46. Levi-Castillo R. Atlas de los anofelinos sudamericanos. Guayaquil: Imprenta de la Sociedad Filantrópica del Guayas; 1949. p. 206.
 47. Levi-Castillo R. Lista provisional de los mosquitos *Culex* del Ecuador. Physis. 1949;20:190-3.
 48. Levi-Castillo R. Estudio taxonómico sobre los principales vectores de la fiebre amarilla selvática en América del Sur. I. Terminalias masculinas de los mosquitos *Haemagogus*. Rev Cubana Med Trop Parasitol. 1951;7:13-6.
 49. Levi-Castillo R. Notas sobre la dispersión del género "*Haemagogus*" en América del Sur y su importancia en la epidemiología de la fiebre amarilla selvática. Revista de Sanidad e Higiene Pública. 1951;25:213-21.
 50. Levi-Castillo R. Los mosquitos del género *Haemagogus*-Williston, 1896 en América del Sur. Cuenca: Editorial "Don Bosco"; 1951. p. 77.

51. Levi-Castillo R. Epidemiologic studies on jungle yellow fever in the provinces of Manabi and Esmeraldas of the coastal zone of the Republic of Ecuador. *Rev Cubana Med Trop Parasitol.* 1952;8:76-81.
52. Levi-Castillo R. The epidemiology of jungle yellow fever in coastal regions of Ecuador. *Z Tropenmed Parasitol.* 1953;4:254-65.
53. Levi-Castillo R. The appearance of resistance to residual insecticides in *Culex pipiens quinquefasciatus (fatigans)* in the city of Guayaquil. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología.* 1953;1:7-16.
54. Levi-Castillo R. Distribution of *Haemagogus* Mosquitoes in Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología.* 1954;2:410-6.
55. Levi-Castillo R. *Wyemyia (Wyeomyia) aphobema* var. *aequatorialis* var. n., a new sabethine mosquito from Ecuador (Diptera: Culicidae). *Proc R Entomol Soc London.* 1952;21:130-3.
56. Levi-Castillo R. Una nueva especie de *Culex* procedente de la Provincia de Los Ríos, Ecuador: *Culex (Carrollia) babahoyensis* N. Sp. (Diptera-Culicidae). *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología.* 1953;1:91-4.
57. Levi-Castillo R. *Toxorhynchites aequatorianus* n. sp., especie nueva de *Toxorhynchites* hallada en Pichilingue, Los Ríos, Ecuador (Diptera-Culicidae). *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología.* 1953;1:71-9.
58. Levi-Castillo R. Dos especies nuevas de mosquitos ecuatorianos. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología.* 1953;1:14-8.
59. Levi-Castillo R. Dos especies nuevas de mosquitos de la sierra ecuatoriana (Diptera-Culicidae). *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología.* 1953;1:63-70.
60. Levi-Castillo R. *Aedes garciai* n. sp., un aedino nuevo para la fauna ecuatoriana. *Lanesia*, nuevo subgénero de *Aedes*. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología.* 1953;1:101-9.
61. Levi-Castillo R. *Culex (Phalangomyia) azuayus* n. sp., un nuevo mosquito de altura del Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología.* 1954;2:263-71.
62. Levi-Castillo R. Cuatro especies nuevas de Sabethini del Ecuador (Diptera-Culicidae). *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología.* 1954;2:247-60.
63. Levi-Castillo R. *Phoniomyia esmeraldasii*, a new mosquito from Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología.* 1955;2:389-92.
64. Levi-Castillo R. Un nuevo anofelino de altura del Ecuador: *Anopheles gomezdelatorrei* n. sp. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología.* 1955;2:509-16.
65. Levi-Castillo R. Notas sobre la fauna culicidiana de las Provincias de Azuay y Cañar en la Región Austral del Ecuador (Diptera-Culicidae). *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología.* 1954;2:39-50.
66. Levi-Castillo R. Catálogo de los anofelinos de la República del Ecuador. Guayaquil: Artes Gráficas Senefelder C.A.; 1945. p.172.
67. Levi-Castillo R. The possible role of *Chara fragilis* in mosquito control. *Science.* 1944;100:266. <https://doi.org/10.1126/science.100.2595.266>
68. Levi-Castillo R. Experiments on control of mosquitos by means of Characeae. *Boletín del Instituto Botánico de la Universidad Central del Ecuador.* 1945;5:123-8.
69. Levi-Castillo R. Una caja para transportar larvas de mosquito vivas. *Rev Cubana Med Trop Parasitol.* 1947;3:211-2.
70. Levi-Castillo R. Key for the Identification by means of the male genitalia of the principal genera, subgenera and species of Anophelinae of Ecuador. *Revista Médica de Córdoba.* 1944;8:14.
71. Levi-Castillo R. El uso del alcohol polivinílico de viscosidad media como un medio para el montaje de las larvas, pupas y terminalia masculina de los mosquitos. *Rev Cubana Med Trop Parasitol.* 1950;6:76-8.
72. Metcalfe CR, Richardson FR. The use of polyvinyl alcohol and related compounds as a mounting medium for microscope slides. *Kew Bull.* 1949;4:569-71.
73. Anónimo. Dr. Roberto Levi-Castillo: Diario El Telégrafo. In Guayaquil, Ecuador: Club Filatélico Guayaquil; 2018. Fecha de consulta: 8 de marzo de 2018. Disponible en: <http://www.guayaquilfilatelico.org/biblioteca.php>

74. Bataille A, Cunningham AA, Cedeño V, Patiño L, Constantinou A, Kramer LD, *et al.* Natural colonization and adaptation of a mosquito species in Galápagos and its implications for disease threats to endemic wildlife. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:10230-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901308106>
75. Campos FR. Estudios sobre la fauna entomológica del Ecuador. 2° Dipteros Nematóceros: Fam. Culicidae (Mosquitos). *Revista del Colegio Nacional Vicente Rocafuerte*. 1922;18-30.
76. Levi-Castillo R. Notes on Ecuadorian mosquitoes- *Haemagogus equinus* in Ecuador and further taxonomic notes on *Uranotaenia* Levi-Castillo 1953. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología*. 1954;2:83-8.
77. Dyar HG. New American mosquitoes. *Insector Inscitiae Menstruus*. 1918;6:120-9.
78. Dyar HG. The mosquitoes of the Americas. Washington, D.C.: Carnegie Institution of Washington; 1928.
79. Levi-Castillo R. Nota taxonómica sobre la especie ecuatoriana *Aedes (Ochlerotatus) camposanus* Dyar 1918 (Dipt. Culicidae). *Rev Entomol*. 1951;22:383-8.
80. Levi-Castillo R. Redescription of *Aedes (Ochlerotatus) camposanus* Dyar (1918) as a valid species found in the Coastal Plain of Ecuador. *Pacific Science*. 1952;VI:262-4.
81. Arnell JH. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXIII. A revision of the *Scapularis* Group of *Aedes* (Ochlerotatus). *Contrib Am Entomol Inst*. 1976;13:1-144.
82. Dyar HG. Some mosquitoes from Ecuador (Diptera, Culicidae). *Insector Inscitiae Menstruus*. 1925;13:27-31.
83. Lane J. Neotropical Culicidae - Volume I - Dixinae, Chaoborinae and Culicinae, tribes Anophelini, Toxorhychitini and Culicini (Genus *Culex* only). Vol. I. São Paulo: University of São Paulo; 1953. p. 550.
84. Bram R. Clasificación de los mosquitos *Culex* del subgénero *Culex* (Diptera: Culicidae) en el Nuevo Mundo. *Proceedings of the United States Natural Museum*. 1967;120:1-122.
85. Stone A, Knight KL, Starcke H. A synoptic catalog of the mosquitoes of the world (Diptera, Culicidae). Washington, D.C.: Entomological Society of America, Thomas Say Foundation; 1959. p. 358.
86. Stone A. A synoptic catalog of the mosquitoes of the world, supplement III. (Diptera: Culicidae). Catálogo sinóptico de los zancudos del mundo, suplemento IV (Diptera: Culicidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*. 1967;69:197-224.
87. Zavortink T. The new sabethine genus *Johnbelkinia* and a preliminary reclassification of the composite genus *Trichoprosopon*. *Contrib Am Entomol Inst*. 1979;17:p. 1-61.
88. Levi-Castillo R. Nueva división sistemática del género *Haemagogus* Williston 1896 y una nueva especie ecuatoriana: *Haemagogus garciai*, n. sp. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología*. 1955;2:359-66.
89. Lane J. Quatro especies novas de *Culex* da Regiao Neotropical. *Rev Entomol Rio Janeiro*. 1945;16:204-9.
90. Grjebine A. Insectes Diptères Culicidae Culicinae Ficalbiini. Vol. 68, Faune de Madagascar. Paris: Muséum Nationale d'Histoire Naturelle; 1986. p. 441.
91. Bértola L, Ocampo JA. Latin America. In: Baten J. A history of the global economy 1500 to the present. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2015. p. 121-57.
92. Vega-Jurado J, Fernández-de-Lucio I, Huanca R. University-industry relations in Bolivia: Implications for university transformations in Latin America. *High Education*. 2008;56:205-20.
93. Arocena R, Sutz J. Latin American universities: from an original revolution to an uncertain transition. *High Education*. 2005;50:573-92.
94. Canizares-Esguerra J, Cueto M. Latin American Science: The Long View. *NACLA Rep Am*. 2016;35:265-581.
95. Saldaña JJ. Science in Latin America: A history. Austin: The University of Texas Press; 2006.
96. Jameson K. Higher education in a vacuum: Stress and reform in Ecuador. *High Education*. 1997;33:265-81.

Supplementary material

List of mosquito species collected, described, and reported by F. Campos-Rivadeneira and R. Levi-Castillo for Ecuador. For each species, the collection localities reported on their publications are listed.

Subfamily Anophelinae

Genus *Anopheles* Meigen, 1818

Subgenus *Anopheles* Meigen, 1818

1. *Anopheles (Anopheles) apicimacula* Dyar & Knab, 1906. Guayas, El Oro, Los Ríos, Manabí, and Esmeraldas (1). No specific locality data (2).
2. *Anopheles (Anopheles) eiseni* Coquillett, 1902. Esmeraldas, Manabí, Guayas, Los Ríos, El Oro, Chimborazo, Pichincha, Azuay, Cañar, Loja, Cotopaxi, Imbabura, and Carchi. Up to 2000 m (1). No specific locality data (2).
3. *Anopheles (Anopheles) mediopunctatus* Lutz, 1903. Guayas: Guayaquil and its surroundings (3). Esmeraldas, Los Ríos, Manabí, and Guayas (1). No specific locality data (Levi-Castillo 1958).
4. *Anopheles (Anopheles) neomaculipalpus* Curry, 1931. Cañar, Azuay, and Loja (2).
5. *Anopheles (Anopheles) peryassui* Dyar & Knab, 1908. No specific locality data (2).
6. *Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis* Theobald, 1901. Guayas: Guayaquil and its surroundings (3). Guayas: Milagro (4). From sea level up to 2500 m (1).
7. *Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis* ssp. *Levicastilloi* Levi-Castillo 1944. Type locality: Ecuador, Guayas, from Bucay to Progreso (5). Guayas: Bucay (1). Coastal lowland regions up to 300 MASL; provinces of Esmeraldas, Manabí, Los Ríos, Guayas, and El Oro (1). No specific locality data (5).
8. *Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis* ssp. *rivadeneirai* Levi-Castillo 1945. Type locality: Ecuador, Inter-Andean region valleys up to 2500 MASL, provinces of Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar, Azuay, and Loja (1). Pichincha: Los Chillos Valley (6). No specific locality data (2).
9. *Anopheles (Anopheles) punctimacula* Dyar & Knab, 1906. Guayas: Guayaquil and its surroundings, Chobo, Barraganetal, San Rafael (3,7). Guayas: Guayaquil (8). Guayas: Milagro (4). El Oro, Los Ríos, Esmeraldas, Manabí, Guayas, up to 280 m (1).
10. *Anopheles (Anopheles) shannoni* Davis, 1931. No specific locality data (2).

Subgenus *Kerteszia* Theobald, 1905

11. *Anopheles (Kerteszia) boliviensis* (Theobald, 1905). Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (1).
12. *Anopheles (Kerteszia) homunculus* Komp, 1937. No specific locality data (2).
13. *Anopheles (Kerteszia) neivai* Howard, Dyar & Knab, 1913. Guayas: Guayaquil, Posorja (3,7). Esmeraldas, Manabí, Guayas, El Oro, Los Ríos (1).

Subgenus *Lophopodomyia* Antunes, 1937

14. *Anopheles (Lophopodomyia) gomezdelatorrei* Levi-Castillo, 1955. Type locality: Ecuador, Carchi, Chiltazon, altitude 2,880 m, cave (2,9).
15. *Anopheles (Lophopodomyia) squamifemur* Antunes, 1937. No specific locality data (2).
16. *Anopheles (Lophopodomyia) vargasi*. Gabaldón, Cova García & López, 1941. No specific locality data (2).

Subgenus *Nyssorhynchus* Blanchard, 1902

17. *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* Wiedemann, 1820. Guayas: Guayaquil (8). Guayas: Guayaquil, Durán, San Rafael, Posorja (3). Guayas: Milagro (4). Guayas, El Oro, Manabí, Los Ríos, Esmeraldas (1). No specific locality data (2).
18. *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis* Curry, 1932. Esmeraldas, Guayas, Manabí, Santa Elena: Palmar, El Oro (1).
19. *Anopheles (Nyssorhynchus) argyritarsis* Robineau-Desvoidy, 1827. No specific locality data (2).
20. *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926. No specific locality data (2).
21. *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* (Peryassú, 1922). No specific locality data (2).
22. *Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli* Gabaldón, Cova García & López, 1940. No specific locality data (2).
23. *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* Root, 1926. No specific locality data (2).

Subgenus *Stethomyia* Theobald, 1902

24. *Anopheles (Stethomyia) acanthotorynus* Komp, 1937. No specific locality data (2).
25. *Anopheles (Stethomyia) kompi* Edwards, 1930. No specific locality data (2,10).

Genus *Chagasia* Cruz, 1906

26. *Chagasia bathana* (Dyar, 1928). Guayas: Road to Salinas, Manabí (1). No specific locality data (2).

Subfamily Culicinae

Genus *Aedeomyia* Theobald, 1901

Subgenus *Aedeomyia* Theobald, 1901

27. *Aedeomyia (Aedeomyia) squamipennis* (Lynch Arribáizaga, 1878). Guayas: Guayaquil and its surroundings (3). Guayas: Guayaquil, Yaguachi, Milagro, Salitre (11). Guayas, Los Ríos, El Oro (12).

Genus *Aedes sensu* Meigen, 1818

Subgenus *Georgecraigius* Reinert, Harbach & Kitching, 2006

28. *Aedes (Georgecraigius) fluviatilis* (Lutz, 1904). Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Arajuno, Shell-Mera (11). No specific locality data (2).

Subgenus *Howardina* Theobald, 1903

29. *Aedes (Howardina) albonotatus* (Coquillett, 1906). Santo Domingo de los Tsáchilas (formerly part of Esmeraldas): Santo Domingo de los Colorados; Esmeraldas: Quinindé (11). Pichincha, Imbabura, Bolivar and Chimborazo (10). No specific locality data (2).
30. *Aedes (Howardina) pseudodominicii* Komp, 1936. Napo (formerly Napo-Pastaza): Ila, Napo, Tena (11). Napo (formerly Napo-Pastaza) (10).
31. *Aedes (Howardina) quadrivittatus* (Coquillett, 1902). Azuay, Cañar, Pichincha, and Imbabura (10). No specific locality data (2).
32. *Aedes (Howardina) sexlineatus* (Theobald, 1901). Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Arajuno (11).

Subgenus *Ochlerotatus* Lynch Arribáizaga, 1891

33. *Aedes (Ochlerotatus) angustivittatus* Dyar & Knab, 1907. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Ila, Napo;

- Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Puyo (11). Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data (2).
34. *Aedes (Ochlerotatus) euplocamus* Dyar & Knab, 1906. Guayas: Milagro (4).
35. *Aedes (Ochlerotatus) fulvus* (Wiedemann, 1828). Guayaquil and its surroundings (3,7).
36. *Aedes (Ochlerotatus) milleri* Dyar, 1922. Cañar, Loja, Chimborazo, Cotopaxi, Pichincha, Imbabura, Azuay: Cuenca, Río Tomebamba, 2600 m (13); Monay, Paute, Girón, Azogues, and Biblián (14). No specific locality data (2).
37. *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* (Rondani, 1848). Guayas: Guayaquil, El Salado, Durán (3,7). Guayas: Guayaquil (8). Guayas: Milagro (4). Guayas: Guayaquil, Chongón, Puná, Yaguachi, Milagro; Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Ila, Napo (11). Guayas, El Oro, Los Ríos, Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data (2).
38. *Aedes (Ochlerotatus) serratus* (Theobald, 1901). Santo Domingo de los Tsáchilas (formerly part of Esmeraldas): Santo Domingo de los Colorados; Esmeraldas: Quinindé, Viche (11). Guayas, Manabí, Esmeraldas, Pichincha, Los Ríos, and Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data (2).
39. *Aedes (Ochlerotatus) taeniorhynchus* (Wiedemann, 1821). Guayas: Guayaquil, Durán, Posorja (3,7). Guayas: Milagro (4). Guayas: Guayaquil, Yaguachi, Milagro, Puná (11). Guayas, Manabí, Esmeraldas, El Oro, Galápagos (10). No specific locality data (2).

Subgenus *Protomacleaya* Theobald, 1907

40. *Aedes (Protomacleaya) metoecopus* Dyar, 1925. Guayas: Guayaquil and its surroundings (3). Guayas, Manabí, Los Ríos (10). No specific locality data (2).
41. *Aedes (Protomacleaya) terreus* (Walker, 1856). Guayas: Guayaquil, Yaguachi, Milagro, Pascuales, Chongón, Progreso; Manabí: Chone, Calceta, Santa Ana; Esmeraldas: Quinindé (11).

Genus *Coquillettidia* Dyar, 1905

Subgenus *Rhynchoaenia* Brethés, 1910

42. *Coquillettidia (Rhynchoaenia) nigricans* (Coquillett, 1904). Los Ríos(10). No specific locality data (2).

Genus *Culex* Linnaeus, 1758

Subgenus *Aedinus* Lutz, 1904

43. *Culex (Aedinus) amazonensis* (Lutz, 1905). No specific locality data (2).

Subgenus *Anoediopora* Dyar, 1923

44. *Culex (Anoediopora) conservator* Dyar & Knab, 1906. No specific locality data (2).
45. *Culex (Anoediopora) originator* Gordon & Evans, 1922. No specific locality data (2).

Subgenus *Carrollia* Lutz, 1905

46. *Culex (Carrollia) babahoyensis* Levi-Castillo, 1953. Type locality: Ecuador, Los Ríos: Juan Montalvo, Hacienda "Mora" (15,16). Los Ríos (10). No specific locality data (2).
47. *Culex (Carrollia) bihaicola* Dyar & Nuñez Tovar, 1927. Santo Domingo de los Tsáchilas: Santo Domingo de los Colorados (formerly part of Esmeraldas); Esmeraldas: Quinindé (11). Guayas, Manabí, Esmeraldas, and Pichincha (10).
48. *Culex (Carrollia) infoliatu*s Bonne-Wepster & Bonne, 1920. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Ila, Napo; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Puyo, Shell-Mera, Mera (11). Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).

49. *Culex (Carrollia) iridescens* Lutz, 1905. Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (17). Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Ila, Napo, Canelos; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Puyo, Canelos (11). No specific locality data (2).
50. *Culex (Carrollia) metempsytus* Dyar, 1921. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Arajuno, Shell-Mera (11). Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17).
51. *Culex (Carrollia) secundus* Bonne-Wepster & Bonne, 1920. Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Tena, Arajuno, Shell-Mera (11). Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).
52. *Culex (Carrollia) urichii* (Coquillett, 1906). Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Arajuno (11). Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).

Subgenus *Culex* Linnaeus, 1758

53. *Culex (Culex) archegus* Dyar, 1929. Azuay: Cuenca, Monay (11). Azuay: Cuenca (18,19).
54. *Culex (Culex) articularis* Philippi, 1865. Azuay, Cañar, Chimborazo y Loja (10). No specific locality data (2).
55. *Culex (Culex) camposi* Dyar, 1925. Synonym: *Culex coronatorcamposi*, resurrected from syn *coronator* Bram, 1967. Guayas: Guayaquil, Chongón, Yaguachi, Milagro; Los Ríos: Baba, Vinces, Babahoyo, Mocache, Palenque, Quevedo; El Oro: Machala, Puerto Bolívar, Santa Rosa, La Emerenciana, Piñas, Portovelo (11). Guayas, El Oro, Los Ríos (10,17). No specific locality data (2).
56. *Culex (Culex) chidesteri* Dyar, 1921. Napo: Tena, Ila (11). Napo, Orellana, Pastaza (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago and Zamora-Chinchipec (10,17).
57. *Culex (Culex) coronator* Dyar & Knab, 1906. Guayas: Guayaquil, Durán (3,7). Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Ila, Napo; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Puyo (11). Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).
58. *Culex (Culex) guayasi* Levi-Castillo, 1953. Type locality: Ecuador, Babahoyo, Los Ríos(10,20). Los Ríos (10). No specific locality data (2).
59. *Culex (Culex) levicastilloi* Lane, 1945. El Oro: Machala, Santa Rosa, La Emerenciana, Puerto Bolívar(11).El Oro (10). No specific locality data (2).
60. *Culex (Culex) maracayensis* Evans, 1923. No specific locality data (2).
61. *Culex (Culex) mollis* Dyar & Knab, 1906. Guayas: Guayaquil, Tenguel; El Oro: Machala, Puerto Bolívar; Los Ríos: Babahoyo, Vinces, Palenque; Esmeraldas: Esmeraldas, Táchina, Limones; Manabí: Jipijapa, Chone, Santa Ana, Calceta; Napo (formerly Napo-Pastaza): Ila, Napo, Tena (11). Guayas, El Oro, Los Ríos, Manabí, Esmeraldas, Napo (formerly Napo-Pastaza) and Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).
62. *Culex (Culex) nigripalpus* Theobald, 1901. Guayas: Guayaquil and its surroundings (3,7). Guayas: Milagro (4). Guayas: Guayaquil, Yaguachi, Milagro, Venecia, Pascuales, Tenguel, Puná, Chongón, Progreso, Balzar; El Oro: Machala, Puerto Bolívar, Pasaje; Manabí: Portoviejo, Manta; Esmeraldas: Táchina, Quinindé; Los Ríos: Vinces, Mocache, Palenque, Quevedo, Baba, Babahoyo; Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Shell-Mera (11). Guayas, El Oro, Manabí, Los Ríos, Esmeraldas, Napo (formerly Napo-Pastaza), and Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). Azuay: Zhurucuchu and Lullucchas regions (21). No specific locality data (2).
63. *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823. Guayas: Guayas: Guayas: Guayaquil, Durán. Naranjal (3,7). Guayas: Milagro (4). Bolívar (formerly part of Los Ríos): Balsapamba; Guayas: Guayaquil, Chongón, Yaguachi, Milagro, Venecia, Naranjito, Bucay, Progreso, General Villamil, Pascuales, La Toma, Manglaralto, Tenguel,

Puná, Balzar, Daule; Los Ríos: Babahoyo, Baba, Vinces, Jujan, Mocache, Palenque, Quevedo, La Angélica, Barreiro, Montalvo, Playas de Vinces; Esmeraldas: Esmeraldas, Táchina, Quinindé, Río Verde, Limones; El Oro: Machala, Puerto Bolívar, La Emerenciana, Bellavista, Santa Rosa, El Guabo, Pasaje; Manabí: Portoviejo, Manta, Bahía, Junín, Chone, Calceta, Santa Ana, Jipijapa, Puerto Cayo, Machalilla, San Vicente (11). Guayas, El Oro, Los Ríos, Manabí, Esmeraldas, Islas Galápagos, Napo (formerly Napo-Pastaza), and Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). Guayas: Guayaquil (22). No specific locality data (2).

64. *Culex (Culex) quitensis* Levi-Castillo, 1953. Type locality: Ecuador, Pichincha, Quito (18). Cotopaxi, Pichincha, and Imbabura (10). No specific locality data (2).

65. *Culex (Culex) usquatissimus* Dyar, 1922. Guayas: Guayaquil and its surroundings (3).

Subgenus *Melanoconion* Theobald, 1903

66. *Culex (Melanoconion) albinensis* Bonne-Wepster & Bonne, 1920. No specific locality data (2).

67. *Culex (Melanoconion) bastagarius* Dyar & Knab, 1906. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Napo; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Puyo (11). Los Ríos, Guayas, Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (17). No specific locality data (2).

68. *Culex (Melanoconion) comatus* Senevet & Abonnenc, 1939. No specific locality data (2).

69. *Culex (Melanoconion) conspirator* Dyar & Knab, 1906. Guayas: Guayaquil and its surroundings (3). Guayas, Los Ríos, Manabí, Esmeraldas, and El Oro (17). No specific locality data (2).

70. *Culex (Melanoconion) distinguendus* Dyar, 1928. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena (11). Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).

71. *Culex (Melanoconion) dunni* Dyar, 1918. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Napo, Ila (11). Los Ríos, Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).

72. *Culex (Melanoconion) eastor* Dyar, 1920. Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Arajuno (11). Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).

73. *Culex (Melanoconion) educator* Dyar & Knab, 1906. Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Mera, Shell-Mera, Puyo (11). Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).

74. *Culex (Melanoconion) elevator* Dyar & Knab, 1906. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Puyo (11). Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).

75. *Culex (Melanoconion) erraticus* (Dyar & Knab, 1906). Los Ríos (10). No specific locality data (2).

76. *Culex (Melanoconion) innovator* Evans, 1924. No specific locality data (2).

77. *Culex (Melanoconion) inhibitor* Dyar & Knab, 1906. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Ila, Napo (11). Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).

78. *Culex (Melanoconion) iolambdis* Dyar, 1918. No specific locality data (2).

79. *Culex (Melanoconion) madininensis* Senevert, 1936. No specific locality data (2).

80. *Culex (Melanoconion) phlogistus* Dyar, 1920. Los Ríos(10). No specific locality data (2).

81. *Culex (Melanoconion) pilosus* Lee, 1946. Guayas: Guayaquil and its surroundings (3,7). Guayas, Guayas: Guayaquil, Yaguachi, Milagro, Pascuales; Los Ríos: Baba, Babahoyo, Vinces, Mocache; El Oro: Machala, Santa Rosa, Pasaje, La Emerenciana, Bellavista; Esmeraldas: Esmeraldas, Limones, Río Verde, Táchina; Napo (formerly Napo-Pastaza):Ila, Napo, Tena; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Arajuno (11). Guayas, El Oro, Los Ríos, Manabí, Esmeraldas, Napo (formerly Napo-Pastaza) and Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).

82. *Culex (Melanoconion) plectoporpe* Root, 1927. No specific locality data (2).
83. *Culex (Melanoconion) putumayensis* Matheson, 1934. Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Arajuno (11). Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).
84. *Culex (Melanoconion) saramaccensis* Bonne-Wepster & Bonne, 1920. Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (17).
85. *Culex (Melanoconion) spissipes* (Theobald, 1903). No specific locality data (2).
86. *Culex (Melanoconion) taeniopus* Dyar & Knab, 1907. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Puyo (11). Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).
87. *Culex (Melanoconion) theobaldi* (Lutz, 1904). Los Ríos, Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data (2).

Subgenus *Microculex* Theobald, 1907

88. *Culex (Microculex) chryselatus* Dyar & Knab, 1919. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena; Pastaza: Arajuno (11). Napo, (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).
89. *Culex (Microculex) imitator* Theobald, 1903. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Napo; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Shell-Mera, Arajuno (11). Guayas, Los Ríos, Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).
90. *Culex (Microculex) stonei* Lane & Whitman, 1943. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Napo; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Arajuno (11). Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data (2).

Subgenus *Phenacomyia* Harbach & Peyton, 1992

91. *Culex (Phenacomyia) corniger* Theobald, 1903. Guayas: Guayaquil, San Rafael (23). Guayas: Guayaquil and its surroundings (3). Guayas: Guayaquil, Chongón, Pascuales, Puná; Los Ríos: Vines, Mocache, Quevedo; Esmeraldas: Esmeraldas, Limones; El Oro: Machala, Puerto Bolívar, Santa Rosa; Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Ila, Napo; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Puyo, Shell-Mera, Mera, Arajuno (11). Guayas, El Oro, Manabí, Los Ríos, Esmeraldas, Napo (formerly Napo-Pastaza), and Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (10,17). No specific locality data (2).

Subgenus uncertain

92. *Culex (Subgenus uncertain) aikenii* Aiken & Rowland, 1906. *Nomen dubium* (24). Los Ríos (10). No specific locality data (2).
93. *Culex (Subgenus uncertain) ocellatus* Theobald, 1903. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Ila; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Arajuno (11). Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (17).

Genus *Haemagogus* Williston, 1986

Subgenus *Conopostegus* Dyar, 1925

94. *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924). Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Ila, Napo (11). Napo (formerly Napo-Pastaza) (10).
95. *Haemagogus (Conopostegus) leucotaeniatus* (Komp, 1938). Esmeraldas: Quinindé (11). Esmeraldas, Manabí, and Pichincha (10). No specific locality data (2).

Subgenus *Haemagogus* Williston, 1986

96. *Haemagogus (Haemagogus) albomaculatus* Theobald, 1903. Guayas: El Salado (7).

97. *Haemagogus (Haemagogus) boshelli*. Osorno-Mesa, 1944. Synonym: *Haemagogus garciai* Levi-Castillo, 1955. Esmeraldas: Isla de Changuaral (12,25). No specific locality data (2).
98. *Haemagogus (Haemagogus) equinus* (Theobald, 1903). Guayas: El Salado (7). Later, Levi-Castillo (26) claimed that this species was absent from Ecuador.
99. *Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* Dyar, 1921. Napo (formerly Napo-Pastaza), Morona-Santiago (formerly Santiago-Zamora) (27). Esmeraldas (26). No specific locality data (2).
100. *Haemagogus (Haemagogus) panarchys* Dyar, 1921. Guayas: Guayaquil and its surroundings (3). Guayas: Milagro (4). Guayas: Guayaquil, Guayaquil-Salinas road Km.3, Chongón or Colonche Mountain Range(28). Guayas: Guayaquil, Chongón, Progreso, Yaguachi, Milagro (11). Guayas, El Oro, Los Ríos, Manabí (10,12). "Chongón or Colonche Mountain Range" (actually includes the provinces of Guayas, Manabí, and Esmeraldas) (29). No specific locality data (2)..
101. *Haemagogus (Haemagogus) soperi* Levi-Castillo, 1955. Type locality: Ecuador, Los Ríos, Juan Montalvo (30). Esmeraldas; Manabí; El Oro: Santa Rosa (31). No specific locality data (2).
102. *Haemagogus (Haemagogus) spegazzinii* Brethés, 1912. Santo Domingo de los Tsáchilas (formerly part of Esmeraldas): Santo Domingo de los Colorados; Esmeraldas: Quinindé, Viche; Manabí: Santa Ana, Chone, Jama, Calceta; Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Ila, Napo; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Puyo, Arajuno, Shell-Mera, Mera (11). Santo Domingo de los Tsáchilas: Santo Domingo de los Colorados (32).

Genus *Limatus* Theobald, 1901

103. *Limatus andinus* Levi-Castillo, 1954. Type locality: Ecuador, Los Ríos, Valencia (33). No specific locality data (2).
104. *Limatus durhamii* Theobald, 1901. Guayas: Guayaquil and its surroundings (3). Guayas: Guayaquil, Chongón, Progreso, Yaguachi, Milagro (11). Guayas, Los Ríos, Manabí, Esmeraldas, and El Oro (10).
105. *Limatus guayasi* Levi-Castillo, 1954. Type locality: Ecuador, Guayas, El Empalme (33). No specific locality data (2).

Genus *Lutzia* Theobald, 1903

Subgenus *Lutzia* Theobald, 1903

106. *Lutzia (Lutzia) allostigma* (Howard, Dyar & Knab, 1915). No specific locality data (2).
107. *Lutzia (Lutzia) bigoti* Bellardi, 1862. No specific locality data (2).

Genus *Mansonia* Blanchard, 1901

Subgenus *Mansonia* Blanchard, 1901

108. *Mansonia (Mansonia) humeralis* Dyar & Knab, 1916. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Canelos, Arajuno (11). Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data (2).
109. *Mansonia (Mansonia) indubitans* Dyar & Shannon, 1925. El Oro: Machala, La Emerenciana, Bellavista, Santa Rosa; Manabí: Manta, Bahía de Caraquez, Chone, Calceta, Canuto (11). Guayas, El Oro, Manabí, Los Ríos, Esmeraldas (10). No specific locality data (2).
110. *Mansonia (Mansonia) pseudotitillans* Theobald, 1901. Guayas and Los Ríos (10). No specific locality data (2).
111. *Mansonia (Mansonia) titillans* (Walker, 1848). Guayas: Guayaquil (8). Guayas: Guayaquil, El Salado, Durán, Posorja; Los Ríos: Quevedo (3,7,34). Guayas: Guayaquil, Samborondón, Yaguachi, Milagro; Esmeraldas: Quinindé, Esmeraldas, Limones; Manabí: Jipijapa, Chone (11). No specific locality data (2).
112. *Mansonia (Mansonia) wilsoni* (Barreto & Coutinho, 1944). Manabí (10). No specific locality data (2)

Genus *Onirion* Peyton & Harbach, 2000

113. *Onirion personatum* (Lutz, 1904). Santo Domingo de los Tsáchilas (formerly part of Esmeraldas): Santo Domingo de los Colorados; Esmeraldas: Quinindé, Viche (11). Manabí, Esmeraldas, Los Ríos, Guayas, and Pichincha (10). No specific locality data (2).

Genus *Orthopodomyia* Theobald, 1904

114. *Orthopodomyia fascipes* (Coquillett, 1906). Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena (11). Guayas, Los Ríos, Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data (2).

Genus *Psorophora* Robineau-Desvoidy, 1827

Subgenus *Grabhamia* Theobald, 1903

115. *Psorophora (Grabhamia) cingulata* Fabricius, 1805. Napo: Tena, Dos Ríos (35). No specific locality data (2).

116. *Psorophora (Grabhamia) confinnis* (Lynch Arribalzaga, 1891). Guayas, Manabí, Los Ríos(10). No specific locality data (2).

Subgenus *Janthinosoma* Lynch Arribálzaga, 1891

117. *Psorophora (Janthinosoma) cyanescens* (Coquillett, 1902). Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Ila, Napo; Pastaza: (formerly Napo-Pastaza): Puyo, Mera, Shell-Mera, Arajuno (11). Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data (2).

118. *Psorophora (Janthinosoma) ferox* (Humboldt, 1819). Guayas: Guayaquil and its surroundings (3,7). Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Ila, Napo; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Mera, Shell-Mera, Arajuno; Santo Domingo de los Tsáchilas (formerly part of Esmeraldas): Santo Domingo de los Colorados; Esmeraldas: Quinindé, Viche (11). Guayas, El Oro, Manabí, Esmeraldas, Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data (2).

119. *Psorophora (Janthinosoma) lutzii* (Theobald, 1901). Guayas, Manabí, Los Ríos, Esmeraldas (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data(2).

Subgenus *Psorophora* Robineau-Desvoidy, 1827

120. *Psorophora (Psorophora) ciliata* Fabricius, 1794. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Ila, Napo (11). Manabí, Esmeraldas, Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data (2).

Genus *Sabethes* Robineau-Desvoidy, 1827

Subgenus *Peytonulus* Harbach, 1991

121. *Sabethes (Peytonulus) fabricii* Lane & Cerqueira, 1942. No specific locality data (2).

122. *Sabethes (Peytonulus) identicus* Dyar & Knab, 1907. Manabí: Santa Ana, Chone, Calceta, Canuto, Eloy Alfaro, Flavio Alfaro, Jama, Portoviejo, Colón, Junín, Jipijapa (11). Guayas, Manabí, Los Ríos (10). No specific locality data (2).

Subgenus *Sabethes* Robineau-Desvoidy, 1827

123. *Sabethes (Sabethes) bipartipes* Dyar & Knab, 1906. Guayas (Dyar 1925). Guayas: Guayaquil, Durán, Posorja (3,7,8). Guayas: Milagro (4). Guayas: Guayaquil, Pascuales, Yaguachi, Milagro, Chongón, Progreso, Cerecita, Nobol, Durán, Balzar, Daule (11). Guayas, El Oro, Manabí, Los Ríos (10). No specific locality data (2).

124. *Sabethes (Sabethes) cyaneus* (Fabricius, 1805). Esmeraldas: Quinindé; Santo Domingo de los Tsáchilas (formerly part of Esmeraldas): Santo Domingo de los Colorados (11). Manabí (10). No specific locality data (2).

Subgenus *Sabethoides* Theobald, 1903

125. *Sabethes (Sabethoides) chloropterus* (von Humboldt, 1819). Guayas: Guayaquil and its surroundings (3). Guayas: Guayaquil, Chongón (11). Guayas, El Oro, Los Ríos, Manabí(10). No specific locality data (2).

Genus *Trichoprosopon* Theobald, 1901

126. *Trichoprosopon andinum* Levi-Castillo, 1953. Described as *andinus* (36). Type locality: Ecuador, Cotopaxi, Macuchi (36). No specific locality data (2).
127. *Trichoprosopon compressum* Lutz, 1905. Santo Domingo de los Tsáchilas (formerly part of Esmeraldas): Santo Domingo de los Colorados; Esmeraldas: Quinindé (11). Guayas, Los Ríos, Manabí, and Esmeraldas (10). No specific locality data (2).
128. *Trichoprosopon cotopaxense* Levi-Castillo, 1953. Described as *cotopaxensis*. Changed to *cotopaxense* (37). *Nomen dubium* possible syn. *Trichoprosopon digitatum* & *Johnbelkinia ulopus* (38). Provisionally accepted name (39). *Nomina dubia* (40). Type locality: Ecuador, Cotopaxi, Macuchi (36). No specific locality data (2)
129. *Trichoprosopon digitatum* (Rondani, 1848). Guayas: Guayaquil, Naranjal; El Oro: Machala (3,7). Guayas: Guayaquil, Chongón, Progreso, Tenguel, Puná; Santo Domingo de los Tsáchilas (formerly part of Esmeraldas): Santo Domingo de los Colorados; Esmeraldas: Quinindé (11). Guayas, Manabí, Esmeraldas, Pichincha, and Los Ríos (10). No specific locality data (2).
130. *Trichoprosopon evansae* Antunes, 1942. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Ila (11). Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data (2).
131. *Trichoprosopon lanei* (Antunes, 1937). Synonym: *Goeldia lanei* Antunes, 1937. Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Ila, Napo; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Puyo (11). Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data (2).
132. *Trichoprosopon vonplesseni* (Dyar & Knab, 1906). Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena (11). Napo (formerly Napo-Pastaza) (10,41). No specific locality data (2).

Genus *Toxorhynchites* Theobald, 1901Subgenus *Lynchiella* Lahille, 1904

133. *Toxorhynchites (Lynchiella) bambusicola* Knight & Rozeboom, 1946. No specific locality data (2).
134. *Toxorhynchites (Lynchiella) haemorrhoidalis* (Fabricius, 1787). No specific locality data (2).
135. *Toxorhynchites (Lynchiella) haemorrhoidalis superbus* (Fabricius, 1787). Guayas: Guayaquil and its surroundings (3). Guayas: Guayaquil, Chongón, Nobol, Puná, Tenguel (11). Guayas, Manabí, Los Ríos (10). No specific locality data (2).
136. *Toxorhynchites (Lynchiella) hypoptes* Knab, 1907. Guayas: Guayaquil and its surroundings (3). Guayas: Guayaquil, Chongón, Puná (11). Guayas, Manabí, Esmeraldas, and Los Ríos (10). No specific locality data (2).
137. *Toxorhynchites (Lynchiella) theobaldi* (Dyar & Knab, 1906). No specific locality data (2).
138. *Toxorhynchites aequatorianus* Levi-Castillo, 1953. *Nomen dubium* (42). Type locality: Ecuador, Los Ríos: Pichilingue (43). No specific locality data (2).

Genus *Uranotaenia* Lynch Arribálzaga, 1891Subgenus *Uranotaenia* Lynch Arribálzaga, 1891

139. *Uranotaenia (Uranotaenia) aequatorianna* Levi-Castillo, 1953. Type locality: Los Ríos, Babahoyo (10). No specific locality data (2)
140. *Uranotaenia (Uranotaenia) geometrica* Theobald, 1901. Guayas: Guayaquil and its surroundings (3). Guayas: Guayaquil, Chongón, Nobol, Pascuales, Puna, Tenguel; El Oro: Machala, Santa Rosa, La Emerenciana, Tendales (11). Guayas, El Oro, Los Ríos, and Manabí (10). No specific locality data (2).
141. *Uranotaenia (Uranotaenia) leucoptera* (Theobald, 1907). Los Ríos (10). No specific locality data (2).

142. *Uranotaenia (Uranotaenia) lowii* Theobald, 1901. Guayas: Guayaquil and its surroundings (3,7). Bolívar (formerly part of Los Ríos): Balsapamba; Guayas: Guayaquil, Chongón, Nobol, Pascuales, Puna, Tenguel; El Oro: Machala, Pasaje, Santa Rosa, La Emerenciana, Bellavista; Manabí: Portoviejo, Manta, Chone, Santa Ana, Junín, Calceta, Tosagua, Bahía de Caraquez, San Vicente, Jipijapa, Paján; Esmeraldas: Esmeraldas, Quinindé, Río Verde, Táchina; Santo Domingo de los Tsáchilas: Santo Domingo de los Colorados (formerly part of Esmeraldas); Los Ríos: Babahoyo, Montalvo, Barreiro, Baba, Vices, Mocache, Palenque, Jujan (11). Guayas, Los Ríos, Manabí, Esmeraldas (10). No specific locality data (2).

143. *Uranotaenia (Uranotaenia) pulcherrima* Lynch Arribálzaga, 1891. Guayas: Guayaquil and its surroundings (3). Los Ríos and Guayas (10). No specific locality data (2).

144. *Uranotaenia (Uranotaenia) sapphirina* (Osten Sacken, 1868). Guayas: Guayaquil (8). Los Ríos and Guayas (10). No specific locality data (2).

Genus *Wyeomyia* Theobald, 1901

Subgenus *Dendromyia* Theobald, 1903

145. *Wyeomyia (Dendromyia) complosa* (Dyar, 1928). No specific locality data (2).

Subgenus *Dodecamyia* Dyar, 1918

146. *Wyeomyia (Dodecamyia) aphobema* Dyar, 1918. Synonym: *Wyeomyia aphobema* var. *aequatorialis* Levi-Castillo, 1952. Napo (formerly Napo-Pastaza): near Tena (10,44) "mendeley": {"formattedCitation": "(10,44. No specific locality data (2).

Subgenus *Hystatomyia* Dyar, 1919

147. *Wyeomyia (Hystatomyia) esmeraldasii* (Levi-Castillo, 1955). Described as *Phoniomyia esmeraldasii* by Levi-Castillo (1955). Type locality: Ecuador, Esmeraldas, Island of Changuaral, Ancón de Sardinias Bay (30). No specific locality data (2).

Subgenus *Miamyia* Dyar, 1919

148. *Wyeomyia (Miamyia) codiocampa* Dyar & Knab, 1907. Manabí, Esmeraldas, Guayas, Los Ríos, and El Oro (10). No specific locality data (2).

Subgenus *Nunezia* Dyar, 1928

149. *Wyeomyia (Nunezia) bicornis* (Root, 1928). Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Arajuno (11). Manabí, Esmeraldas, and Napo (formerly Napo-Pastaza) (10).

Subgenus *Phoniomyia* Theobald, 1903

150. *Wyeomyia (Phoniomyia) lassalli* (Bonne-Wepster & Bonne, 1921). Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data (2).

151. *Wyeomyia (Phoniomyia) splendida* Bonne-Wepster & Bonne, 1919. Manabí, Esmeraldas, and Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data (2).

Subgenus *Wyeomyia* Theobald, 1901

152. *Wyeomyia (Wyeomyia) melanopus* Dyar, 1919. No specific locality data (2).

153. *Wyeomyia (Wyeomyia) scotinomus* (Dyar & Knab, 1907). Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena (11). Manabí, Esmeraldas, Los Ríos, and Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data (2).

Subgenus uncertain

154. *Wyeomyia* (Subgenus uncertain) *aequatorianna* Levi-Castillo, 1954. Type locality: Ecuador, Los Ríos, Hacienda Pichilingue (33). No specific locality data (2).

155. *Wyeomyia* (Subgenus uncertain) *amazonica* Levi-Castillo, 1954. Type locality: Ecuador, Napo, Tena. Pastaza (33). No specific locality data (2).
156. *Wyeomyia* (Subgenus uncertain) *chalcocephala* Dyar & Knab, 1906. No specific locality data (2).
157. *Wyeomyia* (Subgenus uncertain) *flui* (Bonne-Wepster & Bonne, 1920). No specific locality data (2).
158. *Wyeomyia melanocephala* Dyar & Knab, 1906. . Napo (formerly Napo-Pastaza): Tena, Ila; Pastaza (formerly Napo-Pastaza): Arajuno (11). Manabí, Esmeraldas, Guayas, Los Ríos, Napo (formerly Napo-Pastaza) (10). No specific locality data (2).

Literature cited

1. Levi-Castillo R. Catálogo de los Anofelinos de la República del Ecuador. Guayaquil: Artes Gráficas Senefelder C.A.; 1945. p. 172.
2. Levi-Castillo R. Provisional list of the Culicidae, Simuliidae, Phlebotomus and Culicoides of Ecuador. Proceedings, Tenth International Congress of Entomology. 1958;3.
3. Campos FR. Estudios biológicos sobre los mosquitos de Guayaquil y alrededores. Revista del Colegio Nacional Vicente Rocafuerte. 1925;7:3-48.
4. Levi-Castillo R. Estudios sobre los Anofelinos de la región del Milagro. Revista de la Asociación de la Escuela de Ciencias Químicas. 1944;3.
5. Levi-Castillo R. El complejo *pseudopunctipennis* en el Ecuador (Diptera, Culicidae). Guayaquil: Imprenta de la Universidad de Guayaquil; 1944.
6. Levi-Castillo R. *Anopheles pseudopunctipennis* in the Los Chillos Valley of Ecuador. J Econ Entomol. 1945;38:385-8.
7. Campos FR. Estudios sobre la Fauna Entomológica del Ecuador. 2º Dipteros Nematóceros: Fam. Culicidae (Mosquitos). Revista del Colegio Nacional Vicente Rocafuerte. 1922;18-30.
8. Campos FR. Un año a caza de criaderos de mosquitos por los pantanos de Guayaquil y sus alrededores. Revista del Colegio Nacional Vicente Rocafuerte. 1924;17-27.
9. Levi-Castillo R. Un nuevo Anofelino de altura del Ecuador: *Anopheles gomezdelatorre* n. sp. Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología. 1955;2:509-16.
10. Levi-Castillo R. Lista provisional y distribución de los mosquitos Culicinos del Ecuador. Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología. 1953;34-45.
11. Levi-Castillo R. Vorläufige Liste der Stechmücken (Uranofaeniini, Toxorhynchitini, Culicini, Aedini und Sabethini) aus Ecuador (Diptera-Culicidae). Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitol. 1952;3:552-9.
12. Levi-Castillo R. The epidemiology of jungle yellow fever in coastal regions of Ecuador. Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitol. 1953;4:254-65.
13. Levi-Castillo R. Nota sobre la especie *Aedes (Ochlerotatus) milleri* Dyar, 1922, encontrada en Cuenca (Azuay), Ecuador, con la redescrición completa de la especie (Diptera-Culicidae). Transactions, Ninth International Congress of Entomology. 1952;1:181-5.
14. Levi-Castillo R. Notas sobre la fauna culicidiana de las Provincias de Azuay y Cañar en la Región Austral del Ecuador (Diptera-Culicidae). Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología. 1954;2:39-50.
15. Levi-Castillo R. Una nueva especie de *Culex* procedente de la Provincia de Los Ríos, Ecuador: *Culex (Carrollia) babahoyensis* n. sp. (Diptera-Culicidae). Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología. 1953;1:91-4.
16. Levi-Castillo R. A new species of *Culex* from Ecuador. Proceedings of the Entomological Society of Washington. 1953;55:161-3.

17. Levi-Castillo R. Lista provisional de los mosquitos *Culex* del Ecuador. *Physis*. 1949;20:190-3.
18. Levi-Castillo R. Observations on the Subgenus *Phalangomyia* of the Genus *Culex* in Ecuador with description of a new species (Diptera, Culicidae). *Pacific Science* 1953;7:187-92.
19. Levi-Castillo R. Nota sobre una especie del subgenero *Phalangomyia* del genero *Culex* encontrada en la Provincia del Azuay (Ecuador): *Culex archeagus* Dyar 1929. *Transactions, 9th International Congress of Entomology*. 1952;1:901-4.
20. Levi-Castillo R. Dos especies nuevas de mosquitos ecuatorianos. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología*. 1953;1:14-8.
21. Levi-Castillo R. *Culex (Phalangomyia) azuayus* N. Sp., un nuevo mosquito de altura del Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología*. 1954;2:263-71.
22. Levi-Castillo R. Studies on *Culex fatigans* in Guayaquil, Ecuador. Morphology of males in strains resistant and non-resistant to chlorinated hydrocarbon insecticides. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología*. 1954;2:7-13.
23. Campos FR. Especies nuevas de insectos ecuatorianos. *Revista del Colegio Nacional Vicente Rocafuerte*. 1921;3:84-92.
24. Belkin JN. *Culex (Melanoconion) aikenii* (A. & R., 1906) a nomen dubium; *ocossa* D. & K., 1919 and *panocossa* Dyar, 1923 both valid. *Mosq Syst Newsl*. 1970;2:59-60.
25. Levi-Castillo R. Nueva división sistemática del género *Haemagogus* Williston 1896 y una nueva especie ecuatoriana: *Haemagogus garciai*, N. Sp. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología*. 1955;2:359-66.
26. Levi-Castillo R. Notes on Ecuadorian Mosquitoes- *Haemagogus equinus* in Ecuador and further taxonomic notes on *Uranotaenia* Levi-Castillo 1953. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología*. 1954;2:83-8.
27. Levi-Castillo R. Los mosquitos del género *Haemagogus*-Williston, 1896 en América del Sur. Cuenca: Editorial "Don Bosco"; 1951. p. 77.
28. Levi-Castillo R. Notas sobre *Haemagogus panarchys* Dyar, 1921 (Diptera, Culicidae). *Revista de Entomología*. 1949;20:165-71.
29. Levi-Castillo R. The *Haemagogus* of South America. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología*. 1954;2:269-302.
30. Levi-Castillo R. *Phoniomyia esmeraldasii*, a new mosquito from Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología*. 1955;2:389-92.
31. Levi-Castillo R. *Haemagogus soperi* N. Sp. mosquito transmisor de Fiebre Amarilla Selvática en el Ecuador (Diptera-Culicidae). *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología*. 1955;2:479-85.
32. Levi-Castillo R. Die Epidemiologie des Buschgelbfiebers in der Küstenebene von Ecuador. *Z Tropenmed Parasitol*. 1953;4:254-65.
33. Levi-Castillo R. Cuatro especies nuevas de Sabethini del Ecuador (Diptera--Culicidae). *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología*. 1954;2:247-60.
34. Campos FR. Estudios Entomológicos en el Ecuador (Mosquitos). *Revista del Colegio Nacional Vicente Rocafuerte*. 1921;5.
35. Levi-Castillo R. *Aedes garciai* N. Sp., un aedino nuevo para la fauna ecuatoriana.- *Lanesia*, nuevo subgénero de *Aedes*. *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología*. 1953;1:101-9.
36. Levi-Castillo R. Dos especies nuevas de mosquitos de la sierra ecuatoriana (Diptera-Culicidae). *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología*. 1953;1(4):63-70.

37. Stone A. A synoptic catalog of the mosquitoes of the world, supplement III. (Diptera: Culicidae). Catálogo sinóptico de los zancudos del mundo, suplemento IV (Diptera: Culicidae). Proceedings of the Entomological Society of Washington. 1967;69:197-224.
38. Zavortink T. The new sabethine genus *Johnbelkinia* and a preliminary reclassification of the composite genus *Trichoprosopon*. Contributions of the American Entomological Institute. 1979;17:1-61.
39. Bisby F, Roskov Y, Orrell T, Nicolson D, Paglinawan L, Bailly N, *et al.* Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2009 Annual Checklist. <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2009/>
40. Clark JW, Linton Y-M, Pecor JE, Pecor D, Stoffer J, Motoki M, *et al.* Walter Reed Biosystematics Unit [Internet]. 2016 [cited 2016 Mar 16]. Available from: <http://www.wrbu.org>
41. Lane J. Neotropical Culicidae. Volume II - Tribe Culicini, Deinocerites, Uranotaenia, Mansonia, Orthopodomyia, Aedemoyia, Aedes, Psorophora, Haemagogus, tribe Sabethini, Trichoprosopon, Wyemoyia, Phoniomyia, Limatus and Sabethes. Vol. II. Sao Paulo, Brazil: University of São Paulo; 1953. p. 553-1112.
42. Stone A, Knight KL, Starcke H. A Synoptic Catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera, Culicidae). Washington, D.C.: Entomological Society of America, Thomas Say Foundation; 1959. p. 358.
43. Levi-Castillo R. *Toxorhynchites aequatorianus* n. sp., especie nueva de *Toxorhynchites* hallada en Pichilingue, Los Ríos Ecuador (Diptera-Culicidae). Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología. 1953;1:71-9.
44. Levi-Castillo R. *Wyemoyia (Wyeomyia) aphobema* var. *aequatorialis* var. n., a new sabethine mosquito from Ecuador (Diptera: Culicidae). Proceedings of the Royal Entomological Society of London. 1952;21:130-3.

Revisión de tema

Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016

Ana Mercedes Rada^{1,2}, Christian Hernández-Gómez³, Eliana Restrepo¹, María Virginia Villegas³

¹ Grupo de Bacterias y Cáncer, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Grupo de Biociencias, Facultad de Ciencias de la Salud, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Medellín, Colombia

³ Grupo de Investigación en Resistencia Antimicrobiana y Epidemiología Hospitalaria, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

Las betalactamasas, enzimas con capacidad hidrolítica frente a los antibióticos betalactámicos, son responsables del principal mecanismo de resistencia en bacterias Gram negativas; las de mayor impacto clínico y epidemiológico en los hospitales, son las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), las de tipo AmpC y las carbapenemasas. El incremento en su frecuencia y su diseminación a nivel mundial ha limitado cada vez más las opciones terapéuticas tanto en infecciones adquiridas en los hospitales como las que se generan en la comunidad.

En Colombia, las redes de vigilancia y los grupos de investigación iniciaron su estudio desde finales de los años 90 y, así, se logró la caracterización molecular de las diferentes variantes; además, se reportó una gran prevalencia y diseminación en los hospitales de mediana y alta complejidad, y se describió el impacto clínico de las infecciones que causan. Dichos estudios han evidenciado el alto grado de endemia de algunas de estas betalactamasas y, en consecuencia, la necesidad de una inmediata implementación de programas para inducir el uso prudente de los antibióticos y de medidas de vigilancia, que permitan controlar y prevenir su diseminación, con el fin de disminuir la morbimortalidad en los pacientes y preservar las opciones terapéuticas disponibles en la actualidad.

En esta revisión, se recopiló la información sobre las variantes, la distribución geográfica y la caracterización molecular de las betalactamasas en Colombia, así como los estudios llevados a cabo desde finales de la década de 90 hasta el 2016, lo cual permitió tener un panorama de las betalactamasas que circulan en diferentes regiones, su incremento en el tiempo y sus implicaciones clínicas.

Palabras clave: betalactamasas; bacterias Gram negativas; infecciones bacterianas; programas de optimización del uso de los antimicrobianos; Colombia.

Distribution and molecular characterization of beta-lactamases in Gram-negative bacteria in Colombia, 2001-2016

Beta-lactamases are enzymes with hydrolytic activity over beta-lactam antibiotics and they are the main resistance mechanism in Gram-negative bacteria. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), AmpC, and carbapenemases have the greatest clinical and epidemiological impact in hospital settings. The increasing frequency and worldwide spread of these enzymes have limited the therapeutic options in hospital-acquired infections and those originating in the community.

In Colombia, surveillance networks and research groups began studying them in the late 90s. Different variants of these enzymes have been molecularly characterized and their high prevalence and dissemination in medium and high complexity hospitals, along with a high clinical impact, have been reported. Furthermore, many studies in Colombia have evidenced high endemicity for some of these beta-lactamases, which requires an urgent implementation of antimicrobial stewardship programs in order to preserve the few therapeutic options and infection control strategies to prevent and limit their dissemination. In this publication, we carried out a review of the different enzyme variants, geographic distribution, and molecular characterization of these beta-lactamases in Colombia. Additionally, we describe the available information in the literature regarding studies conducted between the late 1990s and 2016, which provide an overview of the beta-lactamases circulating in different regions of Colombia, their increase over time, and their clinical implications.

Keywords: Beta-lactamases; Gram-negative bacteria; bacterial infections; antimicrobial stewardship; Colombia.

Las infecciones por bacterias Gram negativas resistentes a múltiples antibióticos, y su elevada frecuencia tanto en hospitales como en la

Recibido: 05/03/18

Aceptado: 03/10/18

Publicado: 12/10/18

Citación:

Rada AM, Hernández-Gómez C, Restrepo E, Villegas MV. Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. *Biomédica*. 2019;39(Supl.1):199-220
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351>

Correspondencia:

Ana Mercedes Rada, Facultad de Ciencias de la Salud, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Carrera 78 No 65-46, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 444 5611
ana.rada@colmayor.edu.co

Contribución de los autores:

Ana Mercedes Rada: diseño del esquema del artículo, búsqueda y organización bibliográfica y elaboración de cuadros y figuras
María Virginia Villegas: diseño del esquema del artículo
Todos los autores participaron en la revisión del tema y en la escritura del manuscrito.

Financiación:

Colciencias - Programa Ciencia Tecnología e Innovación en Salud, código del proyecto: 111556933375

Conflicto de intereses:

Los autores del presente trabajo declaran no tener ningún conflicto de intereses.

comunidad, se ha convertido en un problema de salud pública en el mundo debido a su asociación con hospitalizaciones más prolongadas, mayores tasas de fracasos terapéuticos, aumento de la mortalidad y mayores costos de la atención hospitalaria (1-3).

Estas bacterias tienen diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos, y la producción de betalactamasas es el principal contra la familia de antibióticos más utilizada para combatir las infecciones bacterianas en el mundo (4).

Entre las betalactamasas de mayor impacto clínico, están las de espectro extendido (BLEE), las cuales se han identificado principalmente en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, y son codificadas por genes cromosómicos o plasmídicos (5,6). Las BLEE se definen como betalactamasas capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, una o más oximino-cefalosporinas (en particular, cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima) y monobactámicos (aztreonam); una de sus características es ser sensibles a los inhibidores de las betalactamasas, como el ácido clavulánico, el sulbactam, el tazobactam y el avibactam (7,8).

Otras enzimas de importancia clínica son las betalactamasas de tipo AmpC, presentes en algunas enterobacterias y en bacterias Gram negativas no fermentadoras. Estas pueden ser codificadas por genes cromosómicos y presentarse de forma constitutiva o inducible, o ser adquiridas a través de plásmidos. Las enzimas AmpC son capaces de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación y cefamicinas, y se diferencian de las BLEE en que no son sensibles a los inhibidores de las betalactamasas (9).

Por último, las betalactamasas de tipo carbapenemasas se han identificado principalmente en Enterobacteriaceae, en *Acinetobacter baumannii* y en *Pseudomonas aeruginosa*; su codificación puede ser cromosómica o generarse en genes asociados con varios elementos móviles, como los transposones, los integrones y una variedad de plásmidos, lo que permite su rápida diseminación entre las especies y dentro de ellas. Las carbapenemasas tienen un mayor espectro hidrolítico frente a casi todos los antibióticos betalactámicos, incluidos los carbapenémicos (10).

Los reportes sobre la difusión de las betalactamasas se comenzaron a conocer en Latinoamérica a partir de 1990, específicamente sobre las BLEE en enterobacterias, y algunas de las enzimas tuvieron su origen en este continente. Por otro lado, la aparición y la diseminación de las carbapenemasas en las enterobacterias, en *Pseudomonas* spp. y en *Acinetobacter* spp., dejan pocas opciones terapéuticas debido a la multiresistencia que confieren. El aumento de la frecuencia de los reportes de carbapenemasas en la región, sugiere que se han propagado con éxito y que, incluso, se han hecho endémicas en algunos países (11-13).

En Colombia, los reportes de resistencia se iniciaron a finales de los años noventa, cuando en diversos estudios se demostró un aumento de la frecuencia y la expresión de diferentes tipos de BLEE en *K. pneumoniae* y *E. coli* (14). Posteriormente, se identificaron diferentes clases de carbapenemasas en enterobacterias y bacterias Gram negativas no fermentadoras que, con el tiempo, se diseminaron (15,16).

El panorama de la resistencia de las bacterias Gram negativas en Colombia es complejo. Gracias a los múltiples estudios de caracterización

microbiológica y molecular llevados a cabo por diferentes grupos de vigilancia e investigación del país, se ha logrado conocer la prevalencia, las variantes, la distribución y las implicaciones clínicas de las betalactamasas en los hospitales de diferentes ciudades del país.

El propósito de esta revisión de tema fue recopilar la información disponible en la literatura sobre las diferentes clases y tipos de betalactamasas identificadas en bacterias Gram negativas, su incremento en el tiempo, su diseminación y su actual distribución geográfica en Colombia. Para ello, se hizo una búsqueda bibliográfica en las bases de datos PubMed, SciELO y Google Scholar, y se seleccionaron artículos en español e inglés publicados entre 2001 y 2016.

Clasificación de las betalactamasas

La resistencia a los antibióticos de las bacterias Gram negativas se produce mediante diversos mecanismos, entre los que se pueden mencionar la alteración del sitio blanco de ciertos antibióticos (17), el incremento de la expresión de los sistemas de eflujo (18), la alteración de la permeabilidad de la membrana externa por pérdida de porinas (19) y la producción de enzimas que inactivan los antibióticos, de las cuales las betalactamasas son las más prevalentes (7).

Estas enzimas escinden el enlace amida en el anillo beta-lactámico y se consideran el principal mecanismo de resistencia a la familia de antibióticos betalactámicos (20). Su clasificación se ha basado, tradicionalmente, en su estructura primaria o en sus características funcionales. Por un lado, Ambler las agrupa en cuatro clases moleculares (A a D) con base en la secuencia de aminoácidos (21) y, por el otro, Busch las clasifica en grupos funcionales con base en la inhibición de clases específicas de betalactámicos y en las propiedades de inactivación de los inhibidores de betalactamasas (22).

Entre los grupos funcionales, se encuentra el grupo 1, en el que se ubican las cefalosporinas de clase molecular C (21,22), las cuales son activas contra las cefalosporinas de tercera generación y cefamicinas, como el cefoxitin. Asimismo, usualmente son resistentes a la acción inhibitoria del ácido clavulánico y del sulbactam, y poseen una gran afinidad frente al aztreonam (23,24).

El grupo 2, o de clases moleculares A y D (21,22), incluye las serin-betalactamasas y múltiples subgrupos, de los cuales los de mayor importancia clínica son dos subgrupos de la clase A: las betalactamasas de espectro extendido, que hidrolizan cefalosporinas de amplio espectro y antibióticos monobactámicos, y son inhibidas por el ácido clavulánico, y las serin-carbapenemasas, con capacidad de hidrolizar toda clase de betalactámicos (25). Las de clase D poseen propiedades de hidrólisis frente a los carbapenémicos (26).

Por último, las betalactamasas que requieren de iones divalentes de cinc, se clasifican en el grupo 3 como metalo-betalactamasas de clase molecular B (21,22) y se diferenciaron inicialmente por su habilidad para hidrolizar carbapenémicos, en contraste con su poca afinidad o capacidad hidrolítica frente a los monobactámicos; además, no son inhibidas por el ácido clavulánico o el tazobactam, pero sí por quelantes de iones de metal como el ácido etileno-diamino-tetraacético o EDTA (27).

Betalactamasas de espectro extendido en Colombia

Desde el momento en que se detectaron los primeros casos de infecciones por enterobacterias productoras de BLEE en los hospitales latinoamericanos, se ha observado un aumento constante de la prevalencia y del número de estas enzimas, hasta el punto de considerarse endémica la producción de BLEE en *Klebsiella* spp. en Latinoamérica, con altas tasas de infecciones asociadas a la atención en salud en comparación con las de otras regiones del mundo (11).

La expansión de las BLEE se ha dado rápidamente, en especial las del tipo CTX-M, favorecida por la transferencia horizontal de plásmidos y clones exitosos (11). En Colombia, el panorama no difiere del mundial y en diversos estudios se ha evidenciado la tendencia al aumento de la expresión de CTX-M y su circulación estable, con la expresión simultánea de enzimas de tipo SHV y TEM (14).

Enzimas TEM y SHV

Las betalactamasas de espectro extendido de tipo temoniera (TEM) y la variable de sulfhidrilo (SHV), se derivaron de la sustitución de aminoácidos del grupo de penicilinasas 2b. Las BLEE de tipo TEM se derivaron de los grupos TEM-1 y TEM-2 (28), y las de tipo SHV se derivaron del SHV-1 (29). Son capaces de hidrolizar antibióticos betalactámicos de espectro extendido y son fuertemente inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam. Estas enzimas se han encontrado más frecuentemente en *K. pneumoniae* y *E. coli*, y son codificadas en diferentes plásmidos asociados con otros genes de resistencia a los antibióticos (30). Actualmente, se han descrito 189 variantes alélicas de tipo SHV y más de 200 de tipo TEM (31).

El primer reporte de la enzima SHV en Suramérica se presentó en aislamientos de *K. pneumoniae* de Argentina y Chile en 1988 y 1989, donde se identificaron las variantes de tipo SHV-2 y SHV-5 (32), en tanto que el primer reporte de la TEM se presentó en el 2003 en Argentina, donde se detectaron los tipos TEM-10 y TEM-12 en *K. pneumoniae* (33).

En Colombia, la caracterización de esta familia de enzimas se hizo a partir de aislamientos de *K. pneumoniae* en 2001 y 2002. La betalactamasa SHV-5 fue la más frecuente, con una posible diseminación por transferencia horizontal de plásmidos de conjugación (34).

En 2004, en el estudio de caracterización epidemiológica y molecular llevado a cabo por Villegas, *et al.*, en ocho hospitales de tercer nivel de diferentes ciudades de Colombia, se encontró una alta prevalencia de diversas BLEE en diferentes cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*, con tasas similares a las reportadas en otros países latinoamericanos. Además, se detectó un alto nivel de resistencia simultánea a otra clase de antibióticos, lo que sugiere la presencia de otros posibles mecanismos de resistencia (35).

En los estudios posteriores desarrollados en algunas ciudades, se reportaron diversas BLEE de tipo SHV en *K. pneumoniae* y *E. coli*, entre ellas, las SHV-5, SHV-2a y SHV-12, además de algunas enzimas no detectadas previamente en el país, como SHV-86 y SHV-27 (36-41). Asimismo, este tipo de BLEE se reportó en enterobacterias como *Enterobacter cloacae*, originadas en hospitales y en la comunidad (39,42-44). Ciertos aislamientos presentaron diferentes perfiles de plásmidos, combinaciones de enzimas y resistencia a otros antibióticos no betalactámicos (cuadro 1) (figura 1).

Cuadro 1. Betalactamasas reportadas en Colombia, 2001-2016

Familia BLEE/AmpC/ carbapenemasa	Variante de enzima	Bacteria	Año de recolección del aislamiento	Departamento o ciudad	Año de publicación	Referencia
CTX-M-Grupo 1	Variante no identificada	<i>Kpn</i>	2001-2002	Bogotá*	2003	-
TEM SHV	TEM-1 SHV-5	<i>Kpn</i>	2001-2002	Bogotá	2004	34
TEM SHV	Variante no identificada	<i>Kpn</i> <i>Kox</i> <i>Eco</i>	2002	Medellín, Cali y Bogotá	2004	35
CTX-M-Grupo 1	CTX-M-12	<i>Kpn</i> <i>Kox</i> <i>Eco</i>	2002	Medellín, Cali y Bogotá	2004	52
CTX-M-Grupo 1 CTX-M-Grupo 2	Variante no identificada	<i>Kpn</i> <i>Kox</i> <i>Eae</i> <i>Eco</i>	2004	Bogotá*	2004	-
CTX-M-Grupo 9						
VIM	VIM-8	<i>Pae</i>	1999-2003	Cali	2004	90
VIM	VIM-2	<i>Pae</i>	2004	Barranquilla, Cali y Pereira	2006	16
TEM SHV	Variante no identificada	<i>Ecl</i>	2003	Bogotá	2006	43
CTX-M-Grupo 1	CTX-M-12	<i>Kpn</i>	2001	Bogotá	2006	53
CTX-M-Grupo 1 CTX-M-Grupo 2	CTX-M-15 CTX-M-2	<i>Enterobacteriaceae</i>	2005	Bogotá	2006	54
SHV KPC	KPC-2	<i>Kpn</i>	2005	Medellín	2006	72
Subgrupo OXA-23	OXA-23	<i>Aba</i>	2004-2005	Bogotá	2006	107
KPC	KPC-2	<i>Pae</i> <i>Cfr</i>	2006	Medellín	2007	73
Subgrupo OXA-23 Subgrupo OXA-51	OXA-23 OXA-51	<i>Aba</i>	2005	Cali, Bogotá, Medellín, Pereira, Bucaramanga y Barranquilla	2007	108
Subgrupo OXA-23 Subgrupo OXA-51	OXA-23 OXA-64 OXA-69	<i>Aba</i>	2004	Bogotá	2008	110
SHV CTX-M-Grupo 1 AmpC	Variante no identificada	<i>Kpn, Eco</i>	2005-2006	Barranquilla, Montería, Cartagena y Sincelejo	2009	38
CTX-M-Grupo 1	CTX-M-1 CTX-M-12 CTX-M-12a CTX-M-15 CTX-M-60	<i>Enterobacteriaceae</i>	2004-2005	Bogotá	2009	56
SHV	SHV-2 SHV-5 SHV-12 SHV-86	<i>Kpn, Eco</i> <i>Kpn</i>	2001-2003	Barranquilla y Montería	2010	36
CTX-M-Grupo 1	CTX-M-12	<i>Eclo</i>				
SHV	SHV-2 SHV-12 SHV-27	<i>Kpn</i>	2003-2005	Bogotá	2011	37
CTX-M-Grupo 1	CTX-M-1 CTX-M-12 CTX-M-15 CTX-M-2					
CTX-M-Grupo 2						
TEM	TEM-1 CTX-M-12	<i>Eco</i>	2010	Cali	2011	57
CTX-M-Grupo 1	CTX-M-12a CTX-M-15					
KPC	KPC-2	<i>Pae</i>	2006-2010	Medellín, Bogotá, Barranquilla, Cali y Pereira	2011	76
KPC	KPC-2 KPC-3	<i>Kpn</i>	2008	Medellín	2011	80

VIM	VIM-24	<i>Kpn</i>	2010	Barranquilla	2011	91
TEM	TEM-1	<i>Eclo, Kpn</i>	2009	Medellín, Bogotá, Cali,	2012	39
SHV	SHV 1 ó 2	<i>Kpn</i>		Bucaramanga, Ibagué,		
	SHV-11	<i>Kpn</i>		Barranquilla y Pereira		
	SHV-12	<i>Eclo, Kox, Kpn</i>				
CTX-M-Grupo 1	CTX-M-12	<i>Eclo, Kox, Kpn, Sma</i>				
	CTX-M-15	<i>Kpn</i>				
KPC	KPC-2	<i>Eclo, Eco, Kpn, Sma</i>				
	KPC-3	<i>Kpn</i>				
TEM	CMY-2	<i>Eco, Kpn</i>	2011	Valledupar	2012	40
SHV		<i>Kpn</i>				
CTX-Grupo 1		<i>Eco, Kpn</i>				
AmpC		<i>Eco, Kpn</i>				
KPC	KPC-2	<i>Pae</i>	2010	Cali	2012	92
VIM	VIM-2					
Subgrupo OXA-23	OXA-23	<i>Aba</i>	2005-2007	Bogotá	2012	111
Subgrupo OXA-51	OXA-51					
Subgrupo OXA-24/40	OXA-72	<i>Api</i>	2010	Cali	2012	114
KPC	KPC-2	<i>Kpn</i>	2010	Cali	2013	15
VIM	VIM-24					
TEM	TEM-1	<i>Ecl, Sma, Cfr, Eco</i>	2006-2007	Medellín, Cali y Barranquilla	2013	44
SHV	SHV-12	<i>Ecl, Sma</i>				
CTX-M-Grupo 9	CTX-M-9	<i>Eco</i>				
KCP	KPC-2	<i>Ecl, Sma, Cfr, Eco</i>				
TEM	TEM-1	<i>Eco, Kpn</i>	2011	3 ciudades de Colombia	2013	60
	SHV-2	<i>Kpn</i>				
SHV	SHV-5	<i>Eco</i>				
	SHV-12	<i>Kpn, Eco</i>				
CTX-M-Grupo 1	CTX-M-15	<i>Kpn, Eco</i>				
AmpC	CMY-2	<i>Eco</i>				
KPC	KPC-3	<i>Kpn</i>				
NMC	NMC-A	<i>Ecl</i>	2009	Barranquilla	2013	69
KPC	KPC-2	<i>Pae</i>	2007-2008	Montería	2013	77
NDM	NDM-1	<i>Kpn</i>	2011	Bogotá	2013	99
Subgrupo OXA-23	OXA-23	<i>Aba, Ano</i>	2004-2005, 2007,2009	4 hospitales de Colombia	2013	113
Subgrupo OXA-51	OXA-51	<i>Aba</i>				
Subgrupo OXA-58	OXA-58	<i>Api</i>				
TEM	TEM-1		2008-2009	Villavicencio	2014	41
SHV	SHV-12	<i>Kpn</i>				
CTX-M-Grupo 1	CTX-M-12	<i>Kpn, Eco</i>				
CTX-M-Grupo 8	CTX-M-8	<i>Kpn</i>				
KPC	KPC-2	<i>Kpn</i>				
TEM	KPC-3	<i>Kpn</i>	2008-2010	Bogotá	2014	81
SHV						
CTX-M-Grupo 1						
CTX-M-Grupo 2						
KPC						
KPC		<i>Kpn, Pae</i>	2009-2010	Cali, Medellín, Barranquilla,	2014	78
				Ibagué y Pereira		
IMP	Variante no identificada	<i>Pre</i>	2012-2014	Bogotá	2017	83
GES	Variante no identificada	<i>Citrobacter spp</i> <i>Enterobacter spp</i> <i>Pseudomonas spp</i>	2012-2014	Antioquia, Huila, Valle del cauca, Norte del Santander y Santander	2017	
				Norte del Santander		
Subgrupo OXA-143	OXA-143	<i>Acinetobacter spp.</i>	2012-2014		2017	
KPC	KPC-2	<i>Pae</i>	2012-2014	Medellín	2014	94
VIM	VIM-2					
NDM		<i>Pre, Mmo, Kpn,</i> <i>Eco, Aha, Sfo,</i> <i>Afa</i>	2014	Bogotá, Antioquia, Santander, Valle del Cauca, Huila y Nariño	2014	101
Subgrupo OXA-23	OXA-23	<i>Aba</i>	2009-2012	Medellín, Barranquilla, Bogotá, Pereira, Ibagué, Neiva, Pasto, Bucaramanga y Cali	2014	112

Subgrupo OXA-24/40 Subgrupo OXA-51	OXA-72	<i>Aba</i>	2006	Bogotá	2014	115
KPC	KPC-3	<i>Kpn</i>	2010-2011	Medellín	2015	82
KPC VIM	KPC-2 VIM-2	<i>Pae</i>	2008-2010	Siete ciudades de Colombia	2015	93
NDM	NDM-1	<i>Pre</i>	2012-2013	Bucaramanga, Bogotá y Madrid (Cundinamarca)	2017	100
KPC VIM	KPC-2 KPC-3 VIM-2	<i>Kpn</i> <i>Kpn, Ecl</i> <i>Pae</i>	2012-2014	Medellín	2016	79
TEM SHV CTX-M-Grupo 1 CTX-M-Grupo 8 KPC	TEM-1 SHV-12 CTX-M-15 CTX-M-8 KPC-2 KPC-3	<i>Kpn</i>	2012-2014	Medellín	2016	84
VIM						
NDM	Variante no identificada	<i>Eco</i>	2015	Yopal	2016	102
Subgrupo OXA-48	OXA-48	<i>Kox</i>	2015	Medellín	2016	117

* Resumen de trabajo presentado en congreso.

Aba: *A. baumannii*; *Afa*: *A. faecalis*; *Aha*: *A. haemolyticus*; *Ano*: *A. nosocomialis*; *Api*: *A. pittii*; *Cfr*: *C. freundii*; *Eco*: *E. coli*; *Eae*: *E. aerogenes*; *Ecl*: *E. cloacae*; *Kpn*: *K. pneumoniae*; *Kox*: *K. oxytoca*; *Mmo*: *M. morganni*; *Pae*: *P. aeruginosa*; *Pre*: *P. rettgeri*; *Sma*: *S. marcescens*; *Sfo*: *S. fonticola*

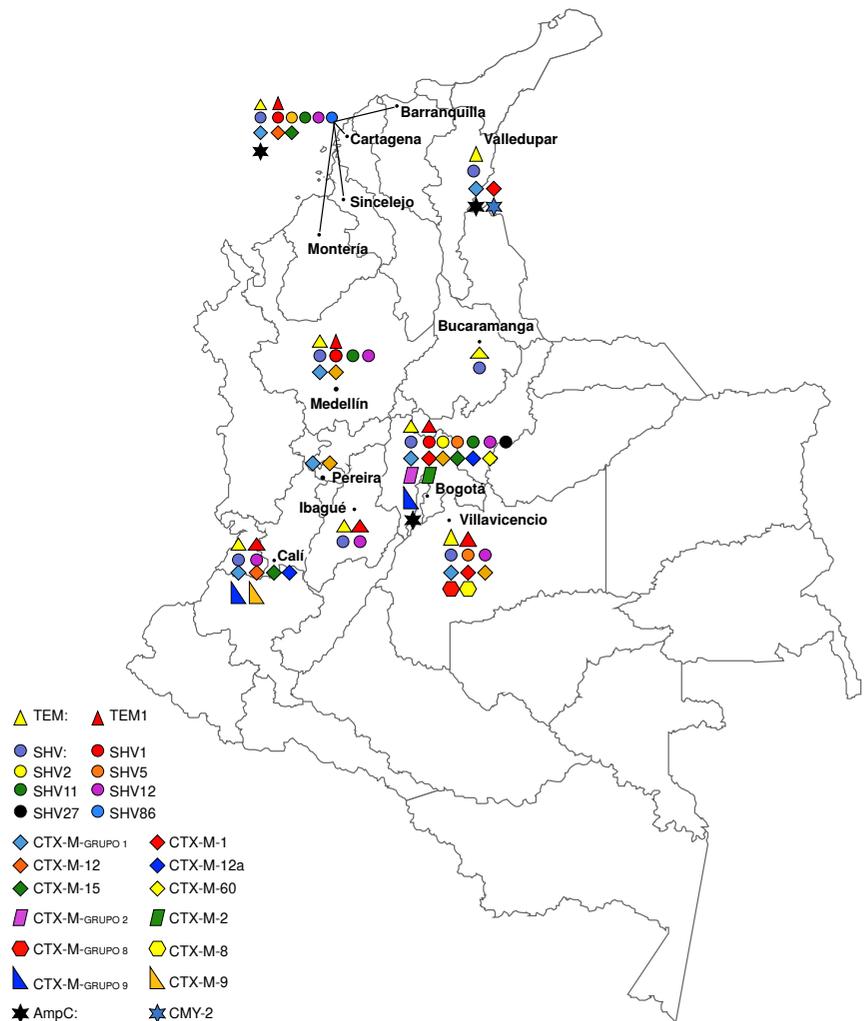


Figura 1. Distribución de BLEE y AmpC en enterobacterias en Colombia

Enzimas CTX-M

Las enzimas cefotaximasas (CTX-M) son un tipo de BLEE que no está relacionado con el grupo de las TEM o las SHV. Hidrolizan la cefotaxima y la ceftriaxona con mayor eficacia que a la ceftazidima, y también, hidrolizan la cefepima con gran eficiencia. Se inhiben mejor con el tazobactam que con el ácido clavulánico (45). Estas enzimas de tipo CTX-M han venido reemplazando las variantes TEM y SHV hasta constituirse en el tipo de BLEE más común y de carácter endémico en una amplia área geográfica, que incluye Latinoamérica, Norteamérica, Asia y Europa (46), y se encuentran tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad (47,48).

Hasta la fecha, se han identificado 172 variantes diferentes de las CTX-M (31), divididas en cinco grupos con base en la secuencia de aminoácidos que poseen: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 (49).

Esta familia de enzimas se detectó inicialmente en 1989 en Alemania oriental, en un aislamiento clínico de *E. coli* (50), aunque fue en Suramérica donde comenzaron a identificarse con gran frecuencia, y es posible que hayan estado en constante circulación desde 1989, como lo sugieren Radice, *et al.* (51).

El primer informe de cefotaximasas del grupo CTX-M-1 en Colombia, se dio a conocer en el VI Congreso de Enfermedades Infecciosas (Cartagena, 2003). Posteriormente, se reportó la presencia del gen *bla*_{-CTX-M12} en uno de siete aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* recolectados en 2002 (52). En los estudios posteriores en diferentes ciudades del país, se registró una alta prevalencia de la enzima CTX-M-12 en cepas de *K. pneumoniae* causantes de infecciones hospitalarias y se encontró, además, en otro tipo de enterobacterias como *E. coli* y *K. oxytoca* (36-38,53,54) (Mantilla JR, Valenzuela EM, González EB, Méndez EM, Leal AL, Sierra P, *et al.* Alta prevalencia de cefotaximasas del grupo CTX-M-1 en Enterobacteriaceae, asociadas a infección intrahospitalaria en Bogotá. Resumen, IV Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Infectio. 2004;8:143). Celis, *et al.*, sugirieron que la presencia de este gen, el *bla*_{-CTX-M12} en plásmidos de conjugación de alto peso molecular, fue la causa de su amplia diseminación entre enterobacterias causantes de infecciones hospitalarias en diferentes regiones del país (55).

Otras cefotaximasas reportadas en *E. cloacae* y *K. pneumoniae* fueron la CTX-M-12a y la CTX-M-15, así como una nueva variante la CTX-M-60, específicamente en *K. pneumoniae* (56), detectadas tanto en aislamientos hospitalarios como de la comunidad. Asimismo, se identificaron la CTX-M del grupo 8 (41) y la CTX-M del grupo 9 (44), con lo cual se demostró la diversidad y la evolución de este tipo de BLEE en el país.

En 2010, se hizo la primera caracterización molecular de cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 pertenecientes a los clones ST131 y ST405, asociados con infecciones adquiridas en la comunidad (57). El potencial de propagación de estos clones se convirtió en un tema de gran preocupación, ya que existían pocos datos sobre los mecanismos de diseminación y control de bacterias resistentes en la comunidad, lo que incentivó el estudio de la prevalencia, el impacto clínico y los factores de riesgo de infección con este tipo de microorganismos (cuadro 1) (figura 1).

Betalactamasas de tipo AmpC en Colombia

Las betalactamasas de espectro extendido de tipo AmpC y de clase molecular C, son activas frente a las penicilinas pero aún más activas frente a las cefalosporinas: pueden hidrolizar oximino-cefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona), cefamicinas (cefotixin y cefotetan) y monobactámicos (aztreonam), a excepción de las cefalosporinas de cuarta generación (cefepima, cefpiroma) y los carbapenémicos. Además, son resistentes a la combinación de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas, pero son inhibidas por el ácido borónico y la cloxacilina (25).

Comúnmente, son codificadas en el cromosoma de ciertas enterobacterias y bacterias Gram negativas no fermentadoras y, por lo general, se expresan de manera inducible por la exposición a ciertos betalactámicos. Asimismo, hay especies bacterianas con betalactamasas de tipo AmpC de codificación plasmídica, que pueden ser inducibles o no; sin embargo, *E. coli* presenta un gen *ampC* cromosómico que se expresa de manera constitutiva, además de los genes *ampC* transferidos mediante plásmidos desde otros microorganismos (9,25).

Las betalactamasas de tipo AmpC plasmídicas fueron descritas por primera vez en Suramérica, en Argentina, en la década de los 90, en un aislamiento de *K. pneumoniae* y fueron denominadas como FOX-1 (58). Posteriormente, se informó sobre la betalactamasa AmpC de tipo CMY-2 en *K. pneumoniae*, *Citrobacter koseri* y *Shigella flexneri* (59).

En Colombia, la primera detección fenotípica de betalactamasas de tipo AmpC se hizo en un estudio desarrollado en 2003 en *E. cloacae* y, de los aislamientos encontrados, 60,7 % presentaron betalactamasa AmpC 'desreprimida' y 32,1 % presentaron su forma inducible. En este estudio, se consideró la dificultad para interpretar la prueba fenotípica para estas enzimas y se sugirió la implementación de técnicas moleculares (43).

Entre 2005 y 2006, en hospitales de ciudades de la región Caribe, se reportó la detección molecular del gen *bla*_{AmpC} en aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE (38), así como la de enzimas AmpC de tipo CMY-2 en *E. coli* y *K. pneumoniae* provenientes de pacientes con infección urinaria adquirida en la comunidad (40,60). Uno de los estudios demostró que los aislamientos portadores de betalactamasa AmpC plasmídica de tipo CMY-2 no presentaban relación clonal, por lo cual Leal, *et al.*, sugirieron que su aparición era esporádica y probablemente asociada con brotes. Esta enzima se ha descrito en aislamientos de muestras de origen humano, y en otras de animales de granja o domésticos (60) (cuadro 1) (figura 1).

Betalactamasas de tipo carbapenemasas en Colombia

Las carbapenemasas representan la familia más versátil de betalactamasas, con capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Los genes que las codifican están localizados en cromosomas y elementos genéticos como los plásmidos, lo que favorece su rápida propagación y la frecuente transferencia de múltiples genes de resistencia a los antibióticos (61). En la última década, se han convertido en una amenaza real para la salud pública a nivel mundial, ya que afectan la última línea terapéutica de betalactámicos disponibles para el tratamiento de infecciones graves por bacterias Gram negativas (62,63).

Las betalactamasas de tipo carbapenemasas se clasifican en dos grandes grupos según el mecanismo hidrolítico de su sitio activo. El primer grupo de estas betalactamasas lo integran las carbapenemasas que poseen serina y en él se encuentran las carbapenemasas de clase A (serin-carbapenemasas), que incluyen las enzimas IMP/NMC, SME, KPC y GES, y las carbapenemasas de clase D (oxacilinasas), que incluyen la enzima OXA. El segundo grupo es el de las carbapenemasas de clase B del grupo de las metalo-betalactamasas, el cual incluye las enzimas IMP, VIM, GIM, SIM y NDM, que necesitan átomos de cinc como cofactor para ejercer su actividad.

Carbapenemasas de clase A

Enzimas NMC-A

Las enzimas NMC-A (no metalo-carbapenemasas de clase A) se identificaron en Francia en 1990, en un aislamiento clínico de *E. cloacae* con resistencia a ampicilina, cefalotina e imipenem, pero con sensibilidad al cefoxitín y a las cefalosporinas de espectro extendido. El gen se codificó en el cromosoma de este microorganismo y difirió de las características fenotípicas de todas las carbapenemasas descritas previamente (64). Posteriormente, en 2003 y 2006, también se identificó en aislamientos de *E. cloacae* en Seattle, Washington y Nueva York (65,66), en el 2004 en Argentina (67), y en el 2012 en Finlandia (68).

El primer reporte en Colombia fue en el 2013, en un aislamiento de *E. cloacae* sensible a las cefalosporinas de espectro extendido, y resistente al cefoxitín y a todos los carbapenémicos (69), hallazgo relevante por ser un nuevo mecanismo de resistencia a los carbapenémicos; además, se encontró que la enzima estaba codificada a nivel cromosómico.

Enzimas KPC

Las enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas) son de la clase molecular A y las más prevalentes a nivel mundial. Hidrolizan eficientemente las penicilinas, las cefalosporinas, los monobactámicos y los carbapenémicos; además, son inhibidas por el ácido borónico y, parcialmente, por los inhibidores de las betalactamasas, como el ácido clavulánico y el tazobactam (61). Actualmente, se reconocen 23 variantes (31).

La primera variante (KPC-1) fue inicialmente descrita en el 2001 en un aislamiento de *K. pneumoniae* en Carolina del Norte (70). Se diseminó rápidamente mediante plásmidos, y se reportó en otras enterobacterias y en bacterias Gram negativas no fermentadoras (71).

El primer reporte de enzimas KPC en Suramérica lo hicieron Villegas, *et al.*, en el 2005 en Colombia. Estos autores detectaron la variante KPC-2 en dos aislamientos de *K. pneumoniae* de diferentes hospitales de Medellín (72). Posteriormente, en el 2007, apareció el primer reporte en el mundo de la KPC-2 en *P. aeruginosa* en esta misma ciudad (73). En el 2008, se caracterizó el transposón *Tn4401* de estos aislamientos, y se sugirió que constituía un elemento genético involucrado en la movilización del gen *bla*_{KPC} a plásmidos, con capacidad de desplazar el gen de su posición inicial a varias regiones del elemento móvil (74).

En los estudios posteriores, se pudo demostrar que los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de la enzima KPC estaban asociados con un clon mayor de linaje genético ST258 y sus variantes cercanas, lo que sugirió que su propagación era internacional. Además, los genes *bla*_{KPC} ubicados en el

transposón *Tn4401* estaban presentes en una variedad de plásmidos, lo que facilitó la rápida propagación de la enzima KPC-2 a *K. pneumoniae* y a otras especies bacterianas (75).

La diseminación de este gen fue reportada en otras especies de enterobacterias y en *P. aeruginosa* en diferentes ciudades del país; el elemento genético móvil, o transposón *Tn4401b*, se caracterizó en algunas enterobacterias (44), lo que planteaba que había surgido tiempo atrás (39,41,76-79).

Otra variante de la enzima KPC, identificada como la KPC-3 en *K. pneumoniae*, causó un primer brote en Colombia. Se estableció que el paciente índice provenía de Israel, lo que evidenció la propagación intercontinental de *K. pneumoniae* productora de KPC-3 (80). Después de este reporte, se demostró que los aislamientos relacionados con el caso índice pertenecían al clon ST512, el cual se integra al complejo clonal 258, lo cual es congruente con estudios previos. Otros hallazgos demostraron la diseminación de la enzima KPC-3 perteneciente al clon ST258 (39,81,82) y su circulación por fuera del ambiente hospitalario en pacientes de diferentes ciudades del país (60). Por ello, Colombia es hoy considerada como una región endémica para las enzimas KPC, con una frecuencia que alcanza el 70,3 % en especies de enterobacterias, según lo ha reportado el grupo de vigilancia del Instituto Nacional de Salud (83).

Recientemente, se publicó un informe sobre la diseminación de la resistencia a los carbapenémicos debida a clones heterogéneos de *K. pneumoniae* no pertenecientes al grupo clonal 258 (GC258) en Medellín, y se sugirió que la transferencia horizontal del gen que codifica para las enzimas KPC ha contribuido a la diseminación de la resistencia a carbapenémicos en este lugar (84) (cuadro 1) (figura 2).

Enzimas GES

Los genes que codifican la familia de las betalactamasas de espectro extendido de Guyana (GES), se han detectado principalmente en integrones de clase 1, localizados en plásmidos y reportados en *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y Enterobacteriaceae. La primera enzima GES se detectó en 1998 en un aislamiento de *K. pneumoniae* (GES-1) en un hospital de Francia y, originalmente, se identificó como integrante de la familia de las BLEE por su espectro de hidrólisis contra penicilinas y cefalosporinas de espectro extendido. Sin embargo, la sustitución de aminoácidos específicos del sitio activo de algunas de las variantes de esta enzima, extendió el espectro de su actividad a los carbapenémicos (61).

Actualmente, se reconocen más de 27 variantes de enzimas GES (31). Estas se han reportado en países latinoamericanos como Brasil (GES-5, GES-16), México (GES-5) y Argentina (GES-2), en *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Serratia marcescens* (13). En Colombia, el Instituto Nacional de Salud reportó por primera vez las enzimas GES en aislamientos de *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., y *Pseudomonas* spp., así como la producción simultánea de KPC más GES y de VIM más GES (83) (cuadro 1) (figura 2).

Carbapenemasas de clase B

Enzimas IMP

La enzima IMP (betalactamasa de clase B que hidroliza imipenem) fue la primera carbapenemasa detectada de la familia de las metalo-betalactamasas en Japón, en un aislamiento clínico de *P. aeruginosa*; fue

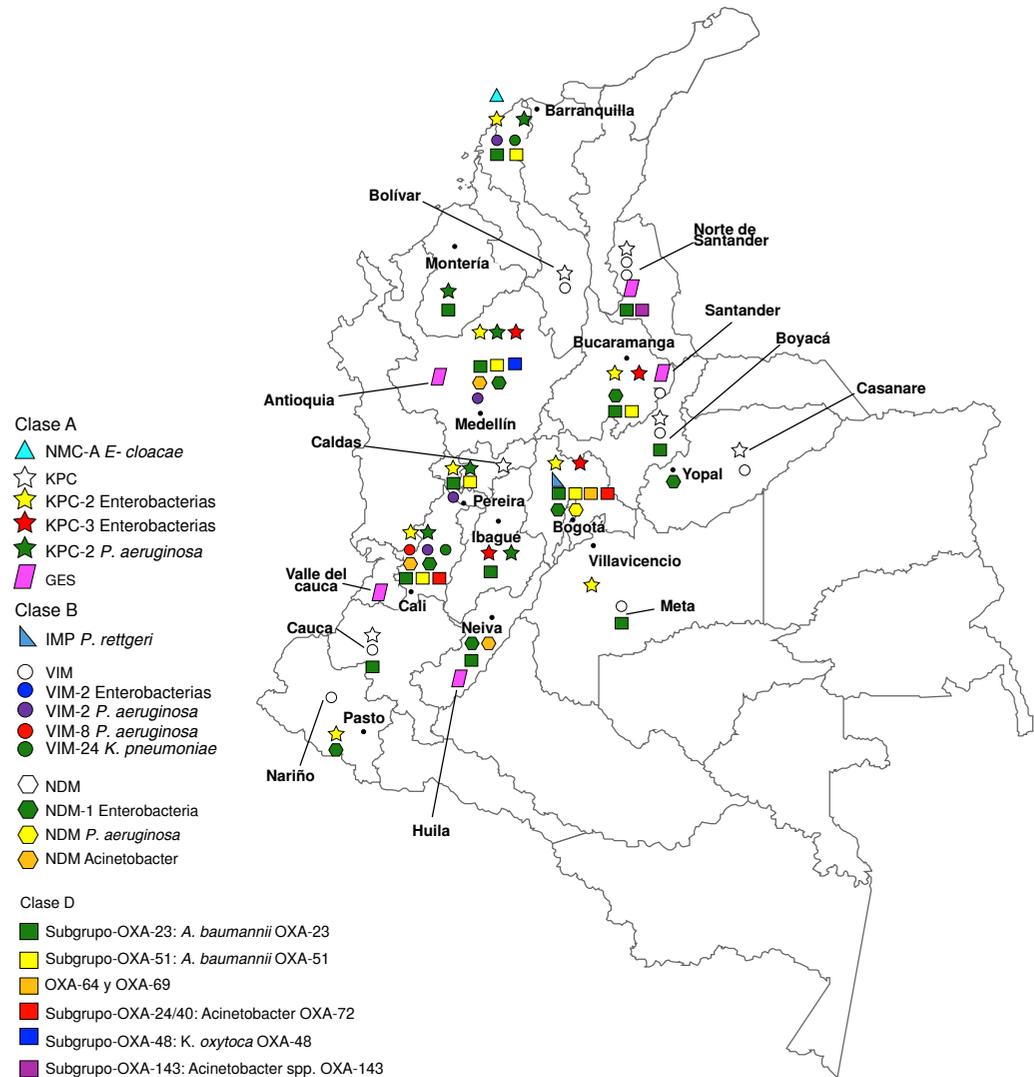


Figura 2. Distribución de carbapenemasas de clase A, B y D en Colombia

identificada en un plásmido de conjugación con un perfil de resistencia a imipenem y a cefalosporinas de espectro extendido (85). Más tarde, en ese mismo país, se identificó en un integrón de *S. marcescens* aislado de un paciente con infección urinaria (86). Las enzimas IMP se han reportado en otros países (61) y ya se han detectado más de 50 variantes (31).

En Latinoamérica, la primera descripción de una enzima IMP (IMP-1) se hizo en un aislamiento de *K. pneumoniae* multirresistente, tomado de una muestra de sangre de un paciente de 75 años de edad con neumonía asociada a la atención en salud (87). En Colombia, existe un solo reporte de enzimas IMP en un aislamiento de *Providencia rettgeri* en Bogotá (83) (cuadro 1) (figura 2).

Enzimas VIM

Entre las carbapenemasas de clase molecular B, se han identificado las enzimas VIM (metalo-betactamasas codificadas por el integrón verona), las cuales constituyen uno de los más grandes subgrupos de las metalo-betactamasas de subclase molecular B1 (MLB B1) (61), de la cual se han descrito 46 variantes (31).

La enzima VIM-1 se detectó por primera vez a finales de los años 90 en el norte de Italia, en un aislamiento clínico de *P. aeruginosa* resistente a los carbapenémicos y asociada con un casete genético insertado en un integrón de clase 1 situado en el cromosoma bacteriano (88). La enzima VIM-2, que comparte el 90 % de identidad con la VIM-1 por los aminoácidos que las componen, es la metalo-betalactamasa más extendida en *P. aeruginosa* y ha sido la fuente de múltiples brotes (89). En Latinoamérica, se ha reportado la enzima VIM-2 en Colombia, Chile, Venezuela, Brasil y Argentina, en aislamientos de *P. aeruginosa* (13).

La primera evidencia de este tipo de enzimas en Colombia se dio a conocer en un estudio realizado entre 1997 y 2003 en Cali, en un brote causado por *P. aeruginosa* productora de la VIM-8 (90). Posteriormente, en el 2006, se detectó la variante VIM-2 en *P. aeruginosa* en varias ciudades de Colombia, donde se identificó el gen *bla*_{VIM-2} en algunos clones sobre el mismo integrón y casete genético, así como la presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (16).

Una nueva variante es la enzima VIM-24, identificada en un aislamiento de *K. pneumoniae* en el 2011, documentado como el primer caso de una infección por enterobacterias con metalo-betalactamasas en el país. El gen fue localizado en un integrón de clase 1 y transportado en un plásmido grande, lo que originó la necesidad de estudios posteriores para aclarar su impacto epidemiológico y clínico (91). En un estudio posterior, en el 2013, se detectó la presencia simultánea de la VIM-24 y la KPC-2 en un aislamiento de *K. pneumoniae*, y su codificación en dos plásmidos diferentes, lo que significó nuevas limitaciones en las opciones terapéuticas (15).

También en Colombia, se describió la presencia de las enzimas VIM-2 y KPC-2 en un mismo aislamiento de *P. aeruginosa*, el cual pertenecía al clon ST111, considerado como un clon exitoso responsable de epidemias en todo el mundo (92). La diseminación de este clon de alto riesgo, se reportó en un estudio del 2014, en el que se incluyeron aislamientos de 16 hospitales de tercer nivel en siete ciudades de Colombia, donde casi todos los aislamientos que portaban el gen *bla*_{VIM-2} pertenecían al clon ST111 de *P. aeruginosa* y solo un tipo de secuencia ST235 se asoció con la enzima KPC-2 (93).

Recientemente, en un estudio de aislamientos de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos en cinco hospitales de tercer nivel de Medellín, se evidenció que la frecuencia de los aislamientos productores de la enzima VIM-2 era similar a la de los aislamientos productores de la KPC-2, lo que sugería una rápida difusión de *P. aeruginosa* productora de estas carbapenemasas. Además, se presentó una estrecha relación genética en los aislamientos dentro de cada hospital, lo que sugería su transmisión intrahospitalaria (94) (cuadro 1) (figura 2).

Enzimas NDM

Las enzimas NDM (metalo-betalactamasas de tipo Nueva Delhi) confieren una alta resistencia a la mayoría de los antibióticos y tienen un gran efecto negativo en los tratamientos. Esta familia de enzimas NDM pertenece a la clase molecular B y comprende 16 variantes (31). Se reportó por primera vez en el 2008 en Nueva Delhi, en un aislamiento de *K. pneumoniae* y *E. coli* recuperado de un paciente sueco. Las enzimas NDM son resistentes a los carbapenémicos y a todos los antibióticos probados, a excepción de la colistina (95). Su diseminación se ha detectado principalmente en enterobacterias y, en menor proporción, en *Acinetobacter* spp. y *P. aeruginosa* (96).

Las enzimas NDM se han reportado en diferentes países de Asia, Europa, África y Norteamérica (97). El primer reporte en Latinoamérica fue en el 2008 en Guatemala, en dos aislamientos de *K. pneumoniae* (98). En Colombia, la enzima NDM-1 se detectó por primera vez en seis aislamientos de *K. pneumoniae* recuperados de un brote que afectó pacientes en una unidad neonatal de Bogotá en el 2011, los cuales pertenecían al clon ST1043 (99).

En los estudios posteriores en diferentes ciudades de Colombia, se demostró la circulación de esta enzima en diferentes bacterias Gram negativas causantes de infecciones asociadas a la atención en salud (100-102), lo cual evidencia un grave problema para el país, por su capacidad de diseminación, incluso en la comunidad, y las pocas opciones terapéuticas para tratar a los pacientes infectados (cuadro 1) (figura 2).

Carbapenemasas de clase D

Enzimas OXA

Las metalo-betalactamasas de clase D se denominaron enzimas de tipo oxacilinasas (OXA), por su capacidad de hidrolizar la oxacilina y la cloxacilina. Sus genes están integrados en el cromosoma, los plásmidos o los integrones. Además, poseen una gran variabilidad en la secuencia de aminoácidos y se han identificado 498 variantes (31), las cuales se caracterizan porque son poco inhibidas por los inhibidores de las betalactamasas y EDTA (61).

En los años 80, se detectaron aislamientos de *A. baumannii* resistentes a los carbapenémicos debido a la presencia de betalactamasas codificadas en plásmidos y categorizadas como enzimas OXA (103). La primera metalo-betalactamasa de tipo OXA se describió en 1993, de un aislamiento de *A. baumannii* con resistencia a múltiples medicamentos, proveniente de un hospital escocés; posteriormente, se denominó OXA-23 y constituyó un nuevo subgrupo de la familia OXA (104,105). Otro subgrupo es el de la OXA-51, identificado por primera vez en *A. baumannii* en Argentina en el 2005, el cual correspondía a enzimas codificadas en el cromosoma y, por lo tanto, presentes de forma natural en este microorganismo (106). Además de estos subgrupos, se han reconocido otros, como los OXA-24/40, OXA-58, OXA-48, OXA-143 y OXA-235, en Latinoamérica y el Caribe (13).

Entre el 2004 y el 2005, en un grupo de aislamientos de *A. baumannii* resistentes a imipenem en una unidad de quemados de Colombia, se detectó el gen *bla*_{OXA-23}, el cual se identificó como un grupo endémico y se estudió durante los diez meses del estudio (107). En el 2007, Villegas, *et al.*, describieron por primera vez la diseminación de la enzima OXA-23 en Suramérica en 66 aislamientos de *A. baumannii* con multiresistencia, todos productores de carbapenemasas de tipo OXA-51 y, 65 de ellos, productores también del tipo OXA-23. La propagación clonal ocurrió entre hospitales de la misma ciudad y entre hospitales de diferentes ciudades (108). Además, se confirmó la presencia de la secuencia de inserción *IS**Aba1* corriente arriba del *bla*_{OXA-23} y el *bla*_{OXA-51}, lo que puede afectar la expresión de estos genes (108,109).

En ese mismo año, se demostró la incidencia de *A. baumannii* productora de la metalo-betalactamasa OXA-23, al detectarse un clon en varios servicios hospitalarios, lo que evidenció su dispersión y la causa de un brote que duró 10 meses, así como la presencia de otros tipos de carbapenemasas OXA-64 u OXA-69 (subgrupo OXA-51), lo que permitió sugerir que la resistencia de los

aislamientos a los carbapenémicos no se ha dado por la expresión conjunta de ambos genes, sino por la sobreexpresión de la carbapenemasa OXA-23 asociada con la presencia de la secuencia de inserción IS*Aba1* (110).

En estudios posteriores, se demostró la presencia de aislamientos de *A. baumannii* productores de OXA-23 en otras ciudades de Colombia (111,112), y se reportó por primera vez la carbapenemasa OXA-143 (91). Asimismo, en aislamientos de *A. nosocomialis* productores de la carbapenemasa OXA-23 y se reportó por primera vez en aislamientos de *A. pittii* y *A. baumannii*, la presencia de la OXA-58 y la OXA-72 del subgrupo OXA-24/40 (113-115).

La carbapenemasa OXA-48, que hidroliza de forma eficiente penicilinas y, debilmente, carbapenémicos, con muy poca actividad contra las cefalosporinas de espectro extendido, se ha reportado principalmente en enterobacterias y se ha detectado cada vez más en muchos países del mundo (116). El primer caso de esta carbapenemasa en Colombia, se registró en el 2016 en un aislamiento de *K. oxytoca* en un hospital de tercer nivel, en un paciente que había sido hospitalizado previamente en dos instituciones diferentes de Medellín y no había viajado a otros países en el año anterior (117). Sin embargo, hasta el momento no se han reportado otros casos de enterobacterias resistentes a los carbapenémicos que produzcan carbapenemasas de tipo OXA-48 en el país (cuadro 1) (figura 2).

En la figura 3, se resume la evolución de las betalactamasas mencionadas a lo largo del manuscrito según su año de aparición en Colombia.

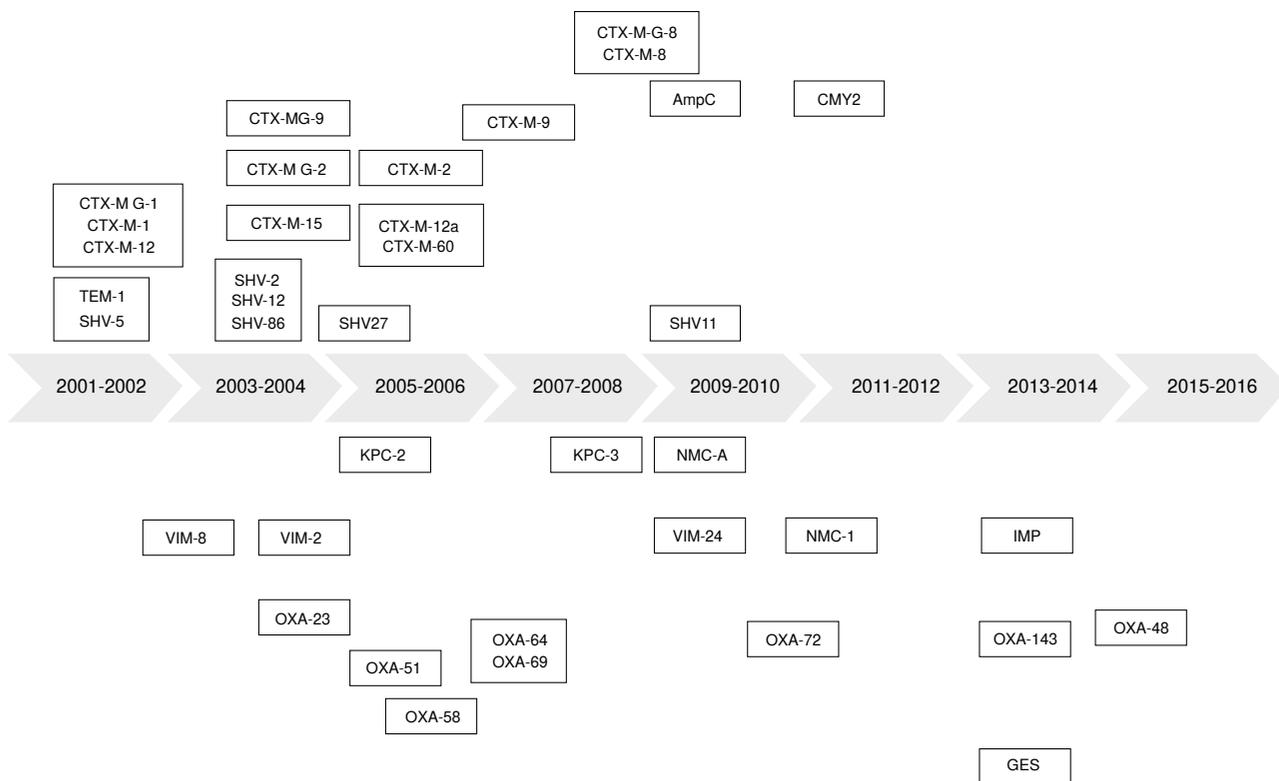


Figura 3. Variantes de BLEE, AmpC y carbapenemasas detectadas en Colombia, 2001-2016

Conclusión

Los estudios de caracterización fenotípica y molecular de la resistencia en enterobacterias, *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. llevados a cabo en varias ciudades de Colombia, han permitido conocer el panorama de la resistencia, la aparición, la circulación y la diseminación de diferentes tipos de betalactamasas, como las BLEE, las AmpC y las carbapenemasas, tanto en hospitales como en la comunidad.

Desde los primeros reportes hasta hoy, se han detectado diferentes variantes de estas enzimas y se ha registrado el aumento de su frecuencia, su rápida propagación y la aparición de clones exitosos. Hay una gran preocupación por la diseminación de carbapenemasas mediante elementos móviles, tanto en enterobacterias como en bacterias Gram negativas no fermentadoras, porque esta limita cada vez más las alternativas terapéuticas y convierte a Colombia en un país endémico para estas enzimas.

De ahí, la necesidad de implementar programas para el uso prudente de los antibióticos en los hospitales del país, de hacer seguimiento ampliado en las ciudades para vigilar su presencia en los hospitales, y de fortalecer las estrategias de prevención y control de infecciones. La detección temprana de estos mecanismos de resistencia, posibilita orientar la elección del mejor tratamiento, contener la diseminación de microorganismos resistentes, y disminuir el costo de la atención, la hospitalización y los fracasos terapéuticos.

Referencias

1. Balsalobre LC, Droga M, Matté MH. An overview of antimicrobial resistance and its public health significance. *Braz J Microbiol.* 2014;45:1-5. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000033>
2. Paterson DL. Impact of antibiotic resistance in gram-negative bacilli on empirical and definitive antibiotic therapy. *Clin Infect Dis.* 2008;47(Suppl.1):S14-20. <https://doi.org/10.1086/590062>
3. Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Falagas ME. Impact of antimicrobial multidrug resistance on inpatient care cost: an evaluation of the evidence. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11:321-31. <https://doi.org/10.1586/eri.13.4>
4. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SM, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci.* 2015;22:90-101. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>
5. Rodríguez I, Thomas K, van Essen A, Schink AK, Day M, Chattaway M, *et al.* Chromosomal location of blaCTX-M genes in clinical isolates of *Escherichia coli* from Germany, The Netherlands and the UK. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43:553-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.02.019>
6. Chouchani C, El Salabi A, Marrakchi R, Abouelkacem N, Walsh TR. Occurrence of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* harboring chromosomally mediated and plasmid-mediated CTX-M-15 β -lactamase in a Tunisian hospital. *Can J Microbiol.* 2012;58:1099-103. <https://doi.org/10.1139/w2012-089>
7. Ruppé É, Woerther PL, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care.* 2015;5:61. <https://doi.org/10.1186/s13613-015-0061-0>
8. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, *et al.* CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:165-74. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl483>
9. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:161-82. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
10. Diene SM, Rolain JM. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:831-8. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12655>

11. Guzmán-Blanco M, Labarca JA, Villegas MV, Gotuzzo E, Latin America Working Group on Bacterial Resistance. Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *Braz J Infect Dis*. 2014;18:421-33. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.10.005>
12. Casellas JM. Antibacterial drug resistance in Latin America: Consequences for infectious disease control. *Rev Panam Salud Pública*. 2011;30:519-28. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892011001200004>
13. Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016;20:1-21. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1268918>
14. González L, Cortés JA. Systematic review of antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates from Colombian hospitals. *Biomédica*. 2014;34:180-97. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.1550>
15. Rojas LJ, Mojica MF, Blanco VM, Correa A, Montealegre MC, De la Cadena E, *et al*. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coharboring KPC and VIM carbapenemases in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:1101-2. <https://doi.org/10.1128/AAC.01666-12>
16. Villegas M, Lolans K, del Rosario-Olivera M, Suárez CJ, Correa A, Queenan AM, *et al*. First detection of metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:226-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.226-229.2006>
17. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: Target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51:1109-17. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg222>
18. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*. 2004;64:159-204. <https://doi.org/10.2165/00003495-200464020-00004>
19. Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD. Insertional inactivation of oprD in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;236:137-43. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09639.x>
20. Jacoby GA, Muñoz-Price LS. The new beta-lactamases. *N Engl J Med*. 2005;352:380-91. <https://doi.org/10.1056/NEJMra041359>
21. Ambler RP. The structure of b-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289:321-31. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
22. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for b-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:1211-33. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.6.1211>
23. Bush K. β -lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clin Microbiol Rev*. 1988;1:109-23. <https://doi.org/10.1128/CMR.1.1.109>
24. Bush K, Freudenberger JS, Sykes RB. Interaction of azthreonam and related monobactams with β -lactamase from gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982;22:414-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.22.3.414>
25. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:969-76. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
26. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57:373-83. <https://doi.org/10.1093/jac/dki482>
27. Laraki N, Franceschini N, Rossolini GM, Santucci P, Meunier C, de Pauw E, *et al*. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:902-6. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.4.902>
28. Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis*. 1988;10:879-84.
29. Tzouveleki LS, Bonomo RA. SHV-type β -lactamases. *Curr Pharm Des*. 1999;5:847-64.
30. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:933-51. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>

31. Lahey Clinic. β -lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. Fecha de consulta: 15 de febrero de 2017. Disponible en: <https://www.lahey.org/studies/>
32. Casellas JM, Goldberg M. Incidence of strains producing extended spectrum beta-lactamases in Argentina. *Infection*. 1989;17:434-6. <https://doi.org/10.1007/BF01645567>
33. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, *et al.* Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:3554-60. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.11.3554-3560.2003>
34. Espinal PA, Mantilla JR, Saavedra CH, Leal AL, Alpuche C, Valenzuela EM. Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido. *Biomédica*. 2004;24:252-61. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v24i3.1271>
35. Villegas MA, Correa A, Pérez F, Miranda MC, Zuluaga T, Quinn JP, *et al.* Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;49:217-22. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.03.001>
36. Espinal P, Garza-Ramos U, Reyna F, Rojas-Moreno T, Sánchez-Pérez A, Carrillo B, *et al.* Identification of SHV- thype and CTX-M-12 extended- spectrum β - lactamases (ESBLs) in multiresistant enterobacteriaceae from Colombian Caribbean hospitals. *J Chemother*. 2010;22:160-4. <https://doi.org/10.1179/joc.2010.22.3.160>
37. Pulido I, Mantilla J, Valenzuela E, Reguero M, González E. Distribución de genes codificadores de β -lactamasas de espectro extendido en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* de hospitales de Bogotá, D.C., Colombia. *Biomédica*. 2011;31:15-20. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i1.331>
38. Gaitán S, Espinal P, Grupo de Investigación en Resistencia Bacteriana Región Caribe. Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la región Caribe, Colombia. *Rev Chil Infect*. 2009;26:239-246. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182009000400006>
39. Mojica MF, Correa A, Vargas DA, Maya JJ, Montealegre MC, Rojas LJ, *et al.* Molecular correlates of the spread of KPC-producing Enterobacteriaceae in Colombia. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40:277-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.05.006>
40. Martínez, P, Garzón D, Máttar S. CTX-M-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from community-acquired urinary tract infections in Valledupar, Colombia. *Braz J Infect Dis*. 2012;16:420-5. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.05.001>
41. Martínez P, Sánchez L, Máttar S. Carbapenemase KPC-2 in ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from two clinics from Villavicencio, Colombia. *Braz J Infect Dis*. 2014;18:100-1. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.09.002>
42. García IA, Valenzuela EM, Saavedra CH, Leal AL, Eslava J, Mantilla JR. Caracterización molecular de aislamientos de *Enterobacter cloacae* multirresistentes, productores β -lactamasas provenientes de pacientes de un hospital de tercer nivel de Bogotá. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia*. 2005;53:148-59.
43. González E, Valenzuela E, Mantilla J, Leal A, Saavedra C, Eslava J. Resistencia a cefepime en aislamientos de *Enterobacter cloacae* provenientes de hospitales de Bogotá, Colombia. *Rev Salud Pública*. 2006;8:191-9. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642006000200007>
44. Cuzon G, Naas T, Correa A, Quinn JP, Villegas MV, Nordmann P. Dissemination of the KPC-2 carbapenemase in non-*Klebsiella pneumoniae* enterobacterial isolates from Colombia. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42:59-62. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.04.002>
45. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -Lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:657-86. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
46. Bonnet R. Growing group of extended spectrum b-lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:1-14. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004>
47. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: An emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008;8:159-66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70041-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70041-0)
48. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, *et al.* Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61:273-81. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm464>

49. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2010;300:371-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.005>
50. Rasmussen JW, Hoiby N. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum beta-lactamases. *Can J Microbiol.* 2004; 50:137-65. <https://doi.org/10.1139/w03-111>
51. Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:602-4. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.602-604.2002>
52. Villegas MV, Correa A, Pérez F, Zuluaga T, Radice M, Gutkind G, *et al.* CTX-M-12 β -lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:629-31. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.629-631.2004>
53. Mantilla JR, Reguero MT, González E, García I, Leal A, Espinal P, *et al.* Caracterización molecular de un brote por *Klebsiella pneumoniae* productora de CTX-M-12 en la unidad de cuidado intensivo neonatal de un hospital colombiano. *Biomédica.* 2006;26:408-14. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i3.359>
54. Valenzuela EM, Mantilla JR, Reguero MT, González EB, Pulido IY, Llerena ID, *et al.* Detection of CTX-M-1, CTX-M-15, and CTX-M-2 in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bogotá, Colombia. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1919-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1919-1920.2006>
55. Celis Y, Pulido I, Valenzuela-de Silva E, Reguero M, Mantilla J. Ambiente genético del gen *bla*CTX-M-12 en aislamientos hospitalarios de *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Colomb Biotecnol.* 2009;11:48-58.
56. Mantilla JR, Barreto E, Reguero MT, Velandia DA. Identifying cefotaximase genes in *Enterobacteriaceae* hospital isolates by PCR-SSCP. *Rev Colomb Biotecnol.* 2009;11:57-65.
57. Ruiz SJ, Montealegre MC, Ruiz-Garrajosa P, Correa A, Briceño DF, Martínez E, *et al.* First characterization of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clones causing community-onset infections in South America. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1993-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.00045-11>
58. González LM, Pérez-Díaz JC, Ayala J, Casellas JM, Martínez-Beltrán J, Bush K, *et al.* Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase with two molecular variants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:2150-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.9.2150>
59. Rapoport M, Monzani V, Pasteran F, Morvay L, Faccone D, Petroni A, *et al.* CMY- 2-type plasmid-mediated AmpC beta-lactamase finally emerging in Argentina. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31:385-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.11.016>
60. Leal AL, Cortés JA, Arias G, Ovalle MV, Saavedra SY, Buitrago G, *et al.* Emergence of resistance to third generation cephalosporins by Enterobacteriaceae causing community-onset urinary tract infections in hospitals in Colombia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31:298-303. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.04.007>
61. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:440-58. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
62. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29:1099-106. <https://doi.org/10.1086/592412>
63. Marchaim D, Chopra T, Pérez F, Hayakawa K, Lephart PR, Bheemreddy S, *et al.* Outcomes and genetic relatedness of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae at Detroit medical center. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011;32:861-71. <https://doi.org/10.1086/661597>
64. Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37:939-46. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.5.939>
65. Pottumarthy S, Moland ES, Juretschko S, Swanzy SR, Thomson KS, Fritsche TR. Nmca carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:999-1002. <https://doi.org/10.3201/eid0908.030096>
66. Deshpande LM, Jones RN, Fritsche TR, Sader HS. Occurrence and characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000-2004). *Microb Drug Resist.* 2006;12:223-30. <https://doi.org/10.1089/mdr.2006.12.223>

67. Radice M, Power P, Gutkind G, Fernández K, Vay C, Famiglietti A, *et al.* First class A carbapenemase isolated from Enterobacteriaceae in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1068-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.1068-1069.2004>
68. Osterblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Finland: The first years (2008-11). *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2860-4. <https://doi.org/10.1093/jac/dks299>
69. Blanco VM, Rojas LJ, De La Cadena E, Maya JJ, Camargo RD, Correa A, *et al.* First report of a nonmetallo-carbapenemase class A carbapenemase in an *Enterobacter cloacae* isolate from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:3457. <https://doi.org/10.1128/AAC.02425-12>
70. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sánchez A, Biddle JW, Steward CD, *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1151-61. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>
71. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009;9:228-36. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4)
72. Villegas M, Lolans K, Correa A, Suárez JC, López JA, Vallejo M, *et al.* First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:2880-2. <https://doi.org/10.1128/AAC.00186-06>
73. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, López JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:1553-5. <https://doi.org/10.1128/AAC.01405-06>
74. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase blaKPC gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1257-63. <https://doi.org/10.1128/AAC.01451-07>
75. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, *et al.* Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce β -lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:1349-56. <https://doi.org/10.3201/eid1609.091389>
76. Cuzon G, Naas T, Villegas MV, Correa A, Quinn JP, Nordmann P. Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing β -lactamase blaKPC-2 gene in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:5350-3. <https://doi.org/10.1128/AAC.00297-11>
77. Buelvas FA, Díaz MA, Muñoz AB, Tovar C. Aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* productor de KPC-2 en la ciudad de Montería, Córdoba, Colombia. *Infectio.* 2013;17:35-8.
78. Pacheco R, Osorio L, Correa A, Villegas MV. Prevalencia de bacterias Gram negativas portadores del gen bla_{KPC} en hospitales de Colombia. *Biomédica.* 2014;34(Supl.1):81-90. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1642>
79. Vanegas JM, Parra OL, Jiménez JN. Molecular epidemiology of carbapenem resistant gram-negative bacilli from infected pediatric population in tertiary - care hospitals in Medellín, Colombia: An increasing problem. *BMC Infect Dis.* 2016;16:463. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1805-7>
80. López JA, Correa A, Navon-Venezia S, Correa AL, Torres JA, Briceño DF, *et al.* Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:52-6. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03209.x>
81. Rodríguez E, Saavedra Y, Leal A, Álvarez C, Olarte N, Valderrama A, *et al.* Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-3 en hospitales de Bogotá durante un periodo de tres años. *Biomédica.* 2014;34(Supl.1):224-31. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1696>
82. Ocampo AM, Vargas CA, Sierra P, Cienfuegos AV, Jiménez J. Caracterización molecular de un brote de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos en un hospital de alto nivel de complejidad de Medellín, Colombia. *Biomédica.* 2015;35:496-504. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i4.2610>
83. Ovalle MV, Saavedra SY, González MN, Hidalgo AM, Duarte C, Beltrán M. Resultados de la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud, Colombia, 2012-2014. *Biomédica.* 2017;37:473-85. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i4.3432>

84. Ocampo AM, Chen L, Cienfuegos AV, Roncancio G, Chavda KD, Kreiswirth BN, *et al.* A two-year surveillance in five Colombian tertiary care hospitals reveals high frequency of non-CG258 clones of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with distinct clinical characteristics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:332-42. <https://doi.org/10.1128/AAC.01775-15>
85. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35:147-51. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.1.147>
86. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, *et al.* Molecular characterization of an enterobacterial metallo β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:71-8. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.1.71>
87. Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM. First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2005;43:516-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.516-519.2005>
88. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, *et al.* Cloning and characterization of *blaVIM*, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:1584-90. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.7.1584>
89. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: The quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:306-25. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005>
90. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5094-101. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5094-5101.2004>
91. Montealegre MC, Correa A, Briceño DF, Rosas NC, De La Cadena E, Ruiz SJ, *et al.* Novel VIM metallo-beta-lactamase variant, VIM-24, from a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:2428-30. <https://doi.org/10.1128/AAC.01208-10>
92. Correa A, Montealegre MC, Mojica MF, Maya JJ, Rojas LJ, De La Cadena EP, *et al.* First report of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate coharboring KPC and VIM carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:5422-3. <https://doi.org/10.1128/AAC.00695-12>
93. Correa A, Del Campo R, Perenguez M, Blanco VM, Rodríguez-Baños M, Perez F, *et al.* Dissemination of high-risk clones of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:2421-5. <https://doi.org/10.1128/AAC.03926-14>
94. Vanegas JM, Cienfuegos AV, Ocampo AM, López L, del Corral H, Roncancio G, *et al.* Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemases in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellín, Colombia. *J Clin Microbiol.* 2014;52:3978-86. <https://doi.org/10.1128/JCM.01879-14>
95. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla(NDM-1)*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:5046-54. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>
96. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int.* 2014;2014:249856. <https://doi.org/10.1155/2014/249856>
97. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:1791-8. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
98. Pasteran F, Albornoz E, Faccone D, Gómez S, Valenzuela C, Morales M, *et al.* Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:1795-7. <https://doi.org/10.1093/jac/dks101>
99. Escobar-Pérez JA, Olarte-Escobar NM, Castro-Cardozo B, Valderrama-Márquez IA, Garzón-Aguilar MI, Martínez-de la Barrera L, *et al.* Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:1957-60. <https://doi.org/10.1128/AAC.01447-12>

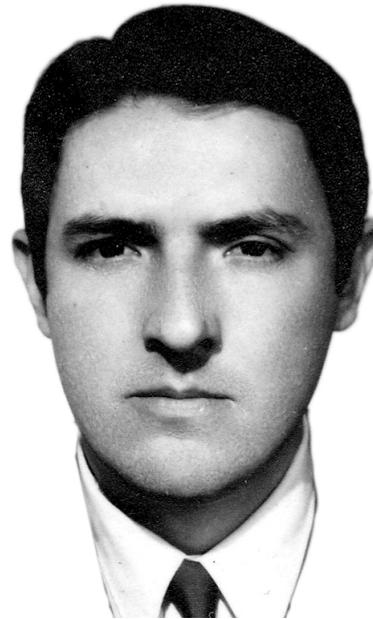
100. Saavedra-Rojas SY, Duarte-Valderrama C, González-de Arias MN, Ovalle-Guero MV. Emergence of *Providencia rettgeri* NDM-1 in two departments of Colombia, 2012-2013. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35:354-8. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.05.011>
101. Instituto Nacional de Salud. Circulación de carbapenemasas tipo Nueva Delhi metalo-betalactamasa (NDM) en Colombia 2012-2014. Bogotá, D.C.: INS; 2014.
102. Correa C, Castro E, Salamanca D, Bustacara L, Lemos E. *Escherichia coli* productora de Nueva Delhi metalo-b-lactamasa en Colombia: reporte de caso. *Infectio*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2016.05.002>
103. Evans BA, Amyes SG. OXA β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27:241-63. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>
104. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 1993;2:81-7. [https://doi.org/10.1016/0924-8579\(93\)90045-7](https://doi.org/10.1016/0924-8579(93)90045-7)
105. Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:196-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.1.196-199.2000>
106. Brown S, Young HK, Amyes SG. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11:15-23. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01016.x>
107. Pinzón JO, Mantilla JR, Valenzuela EM, Fernández F, Álvarez CA, Osorio E. Caracterización molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. *Infectio*. 2006;10:71-8.
108. Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzmán AM, Woodford N, *et al.* Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:2001-4. <https://doi.org/10.1128/AAC.00226-07>
109. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, *et al.* The role of ISAb1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;258:72-7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00195.x>
110. Saavedra SY, Núñez JC, Pulido IY, González EN, Valenzuela EM, Reguero MT, *et al.* Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex isolates in a third-level hospital in Bogotá, Colombia. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31:389-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.12.008>
111. Martínez P, Máttar S. Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAb1-*bla*_{OXA-23,51} and ISAb1-*bla* ADC-7 genes in Montería, Colombia. *Braz J Microbiol*. 2012;43:1274-80. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400006>
112. Hernández-Gómez C, Blanco VM, Mota G, Correa A, Maya JJ, de la Cadena E, *et al.* Evolución de la resistencia antimicrobiana en bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica*. 2014;34(Supl.1):91-100. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1667>
113. Reguero MT, Medina OE, Hernández MA, Flórez DV, Valenzuela EM, Mantilla JR. Antibiotic resistance patterns of *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex species from Colombian hospitals. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31:142-6. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.07.013>
114. Montealegre MC, Maya JJ, Correa A, Espinal P, Mojica MF, Ruiz SJ, *et al.* First identification of OXA-72 carbapenemase from *Acinetobacter pittii* in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:3996-8. <https://doi.org/10.1128/AAC.05628-11>
115. Saavedra SY, Cayô R, Gales AC, Leal AL, Saavedra CH. Early dissemination of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* strain in Colombia: A case report. *Braz J Infect Dis*. 2014;18:678-80. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2014.05.017>
116. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: The phantom menace. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:1597-606. <https://doi.org/10.1093/jac/dks121>
117. Vanegas JM, Ospina WP, Felipe Higuera-Gutiérrez L, Natalia Jiménez J. First reported case of an OXA-48-producing isolate from a Colombian patient. *J Glob Antimicrob Resist*. 2016;6:67-8. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.04.001>

In memoriam

Miguel Antonio Guzmán Urrego 1933-2019

Carlos Arturo Hernández

Comité editorial, revista *Biomédica*, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia



El pasado 7 de abril de 2019 falleció en las instalaciones de la Fundación Cardioinfantil de Bogotá el profesor Miguel Antonio Guzmán Urrego. Teniendo en cuenta la trayectoria tan importante que el profesor Guzmán tuvo en el desarrollo de la Microbiología en el país y su labor como fundador y editor de la revista *Biomédica*, el equipo editorial de la revista *Biomédica* decidió dedicar este número especial a su memoria.

El doctor Guzmán nació en Gachetá, Cundinamarca, el 1° de febrero de 1933. Se graduó como bachiller en el Colegio Rafael María Carrasquilla el 18 de noviembre de 1953 y completó sus estudios universitarios en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, en donde se graduó el 18 de diciembre de 1959 como el mejor estudiante de su promoción.

En marzo de 1962 adelantó durante nueve meses estudios especializados en Medicina Tropical en el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de México; durante el verano de 1964, estudió Virología en el *Department of Medical Microbiology and Immunology* de la *University of California*, Los Ángeles. El 29 de agosto de 1964 recibió el título de *Master of Sciences* en Microbiología e Inmunología de la *Graduate School* de *Tulane University*. La Organización de Estados Americanos le otorgó una beca en 1970 para que se entrenara durante seis meses en Micología y durante tres meses en leptospirosis en el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de México.

El doctor Guzmán fue invitado en múltiples oportunidades a participar como asistente o como conferencista en reuniones convocadas por la Organización Mundial de la Salud, la Organización Panamericana de la Salud, el Instituto de Seroterapia o los *Centers for Disease Control and Prevention*, en diversos temas relacionados con la microbiología o la inmunología; de esta forma, asistió a cursillos o seminarios en Moscú (antigua Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas), Laussane (Suiza), Atlanta (Estados Unidos), Brighton (Reino Unido) y Berna (Suiza). El conocimiento adquirido en todas estas capacitaciones, le permitió convertirse en uno de los pioneros de la investigación y la aplicación de la inmunología en nuestro país.

Como investigador científico en biomedicina, realizó importantes contribuciones al conocimiento científico en Microbiología e Inmunología, incluidos el aislamiento y la identificación de microorganismos de los géneros *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Treponema* y *Brucella*; además, hizo importantes aportes en micología médica, pruebas serológicas, diagnóstico de enfermedades infecciosas, esclerosis múltiple, mieloma múltiple, purificación de anticuerpos, calidad de los laboratorios clínicos y enseñanza de la Microbiología, entre otras.

El 1° de febrero de 1970 se vinculó como profesor del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. El 10 de abril de ese mismo año fue nombrado jefe del recién creado Grupo de Inmunología y Microbiología del Instituto Nacional de Programas Especiales de Salud (INPES). Permaneció en este cargo hasta el 21 de febrero de 1986, cuando el grupo original fue dividido en dos por las directivas del Instituto Nacional de Salud: el de Microbiología, a cargo de Elizabeth Castañeda, y el de Inmunología, a su cargo hasta 1991, cuando renunció a esta responsabilidad y luego fue nombrado oficialmente por Antonio Iglesias como editor de la revista *Biomédica* y asesor del Grupo de Publicaciones por medio de la Resolución 01940 del 7 de octubre de 1991.

Estando como jefe de la Sección de Diagnóstico, Investigación y Referencia del Laboratorio Samper Martínez fundó la revista *Biomédica* en 1981, de la cual fue su editor hasta el año de su retiro de la entidad en 1995. Para la celebración de los 25 años de fundación de la revista, el Comité Editorial decidió invitarlo a ejercer las funciones de editor durante ese año y, desde entonces, se vinculó de manera permanente al Comité Editorial de la revista tomando parte activa en todas las reuniones y cumpliendo con las labores de Editor Asociado hasta el final de sus días. Los miembros del Comité Editorial, sin lugar a dudas, extrañaremos su característico y ácido fino humor y su franqueza para expresar sus opiniones sobre cualquier tema con absoluta asertividad.

El profesor Guzmán ha sido tal vez quien más ha impulsado la producción científica de los funcionarios del Instituto Nacional de Salud. Fue autor de numerosos artículos en revistas nacionales e internacionales, y editor de innumerables notas técnicas, manuales de laboratorio y monografías en el campo de la Microbiología y la Inmunología. También fue uno de los fundadores de la revista *Infectio* de la Asociación Colombiana de Infectología.

Mediante la Resolución 0065 del 24 de enero de 2007, Luis Eduardo Mejía, en su calidad de director del Instituto Nacional de Salud, le otorgó la Condecoración Samper Martínez, honrándolo como creador del Grupo de Microbiología e Inmunología y fundador de la revista *Biomédica*. Fue

miembro de varias sociedades científicas, entre ellas la Sociedad Colombiana de Pediatría, la Sociedad Colombiana de Patología, la Asociación Colombiana de Infectología, la Sociedad Colombiana de Dermatología, la *Tulane Medical Alumni Association* y la *Tulane Alumni Association*.

Exaltamos su memoria. Ha dejado una huella imperecedera entre sus alumnos de las universidades en las que compartía sus conocimientos y, especialmente, entre aquellos que laborábamos con él en las tareas de divulgación de los resultados de las investigaciones científicas y la edición de textos y revistas.

Paz en su tumba. Compartimos con su esposa Maye, y con sus hijos Juan Felipe y María Catalina, el sentimiento de pérdida de un ser íntegro, franco, honesto y sencillo.

Carlos Arturo Hernández Ch.
Revista *Biomédica*, Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia