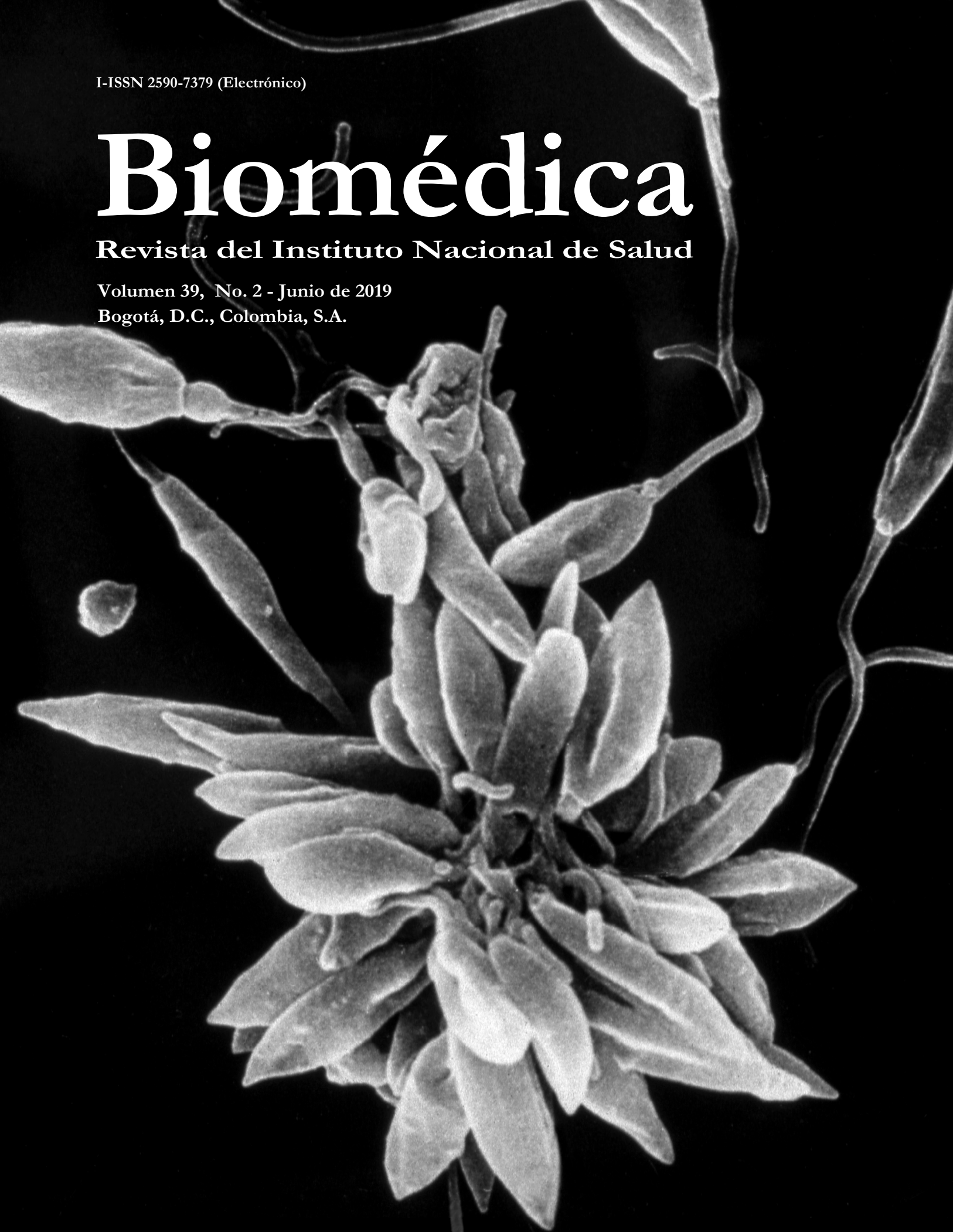
I-ISSN 2590-7379 (Electrónico)

# Biomédica

## Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 39, No. 2 - Junio de 2019
Bogotá, D.C., Colombia, S.A.



**Portada:** Promastigotes de cultivo de *Leishmania* spp.
Microscopía electrónica de barrido, Hitachi S-570, resolución 30Å
Película Kodak VP-120, ISO 125

José B. Yung, Laboratorio de Investigación Clínica, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia
Edición fotográfica: David A. Hernández-Mora, Bogotá, D.C., Colombia

# Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 39, No. 2 - Bogotá, D.C., Colombia - Junio 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 Ardila
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

Antonio Bermúdez
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Jorge H. Botero
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

Gustavo Alonso Cabrera
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

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

Alberto Concha-Eastman
Guatapé, Colombia

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

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

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

Andrés de Francisco
Organización Mundial de la Salud
Ginebra, Suiza

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

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

Jorge Hernando Donado
Universidad Pontificia Bolivariana
Medellín, Colombia

Carlos Andrés Fandiño
Universidad del Valle
Cali, Colombia

José Figueroa
World Health Organization
Ginebra, Suiza

Luis Fernando García
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

Alberto Gómez
Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá, D.C., Colombia

Enrique González
University of Texas Health Science Center
at San Antonio
San Antonio, TX, Estados Unidos

John Mario González
Universidad de los Andes
Bogotá, D.C., Colombia

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

Antonio Iglesias
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

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

Ernesto Jaramillo
Organización Mundial de la Salud
Ginebra, Suiza

Marcelo Labruna
Universidade de São Paulo
São Paulo, Brasil

Jairo Lizarazo
Hospital Universitario Erasmo Meoz
Cúcuta, Colombia

Juan Guillermo McEwen
Corporación para Investigaciones
Biológicas
Medellín, Colombia

Roberto Mendoza
The Hospital for Sick Children
Toronto, Ontario, Canada

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

Ricardo Negroni
Hospital de Infecciosas
Francisco Javier Muñiz
Buenos Aires, Argentina

María Teresa Ochoa
University of California Los Ángeles
Los Ángeles, CA, Estados Unidos

Juan P. Olano
University of Texas Medical Branch
Galveston, TX, Estados Unidos

Blanca Restrepo
University of Texas
Brownsville, TX, Estados Unidos

Gerzaín Rodríguez
Investigador Emérito
Instituto Nacional de Salud
Universidad de la Sabana
Bogotá, D.C., Colombia

Víctor E. Reyes
University of Texas Medical Branch
Galveston, TX, Estados Unidos

Gustavo C. Román
Methodist Neurological Institute
Houston, TX, Estados Unidos

Pedro Romero
Ludwig Center for Cancer Research
University of Lausanne
Lausana, Suiza

Álvaro Ruiz
Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá, D.C., Colombia

Gioconda San Blas
Instituto Venezolano de
Investigaciones Científicas
Caracas, Venezuela

Álvaro Sanabria
Hospital Pablo Tobón Uribe
Medellín, Colombia
Universidad de la Sabana
Chía, Colombia

Ricardo Sánchez
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

Nancy Gore Saravia
Centro Internacional de
Entrenamiento e Investigaciones
Médicas
Cali, Colombia

Robert Tesh
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

Bruno Travi
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

Gustavo Valbuena
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

Juan Miguel Villalobos
Universidade Federal de Rondônia
Porto Velho, Brasil

Moisés Wasserman
Investigador Emérito
Instituto Nacional de Salud
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

Carlos Arturo Hernández — 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 Seriadas Científicas y Tecnológicas Colombianas* de Colciencias y del *Índice Latinoamericano de Revistas Científicas y Tecnológicas* (LATINDEX).

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

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

# Contenido


**Editorial**

Situación actual y perspectivas en el tratamiento de las leishmaniasis tegumentarias en América
*Jaime Soto* ..... 237

**Presentación de caso**

Anisakiasis gastro-alérgica, primera descripción de un caso en Colombia y revisión bibliográfica
*John A. Patiño, Mario J. Olivera* ..... 241

Dermatosis inducida por el agua: queratodermia acuagénica, a propósito de un caso
*Camila Montoya, Liza M. Arias, Mónica Salazar, Rodrigo Restrepo* ..... 247

**Artículo original**

Vigilancia de la fauna flebotomínea e infección de *Didelphis marsupialis* (Didelphimorphia: Didelphidae) en un área de alta endemia de leishmaniasis visceral en Colombia
*Marlon Mauricio Ardila, Lina Carrillo-Bonilla, Adriana Pabón, Sara M. Robledo* ..... 252

Detección y caracterización molecular de cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de triatominos recolectados por la comunidad en el departamento de Córdoba, Colombia
*Cielo León, Mario Iván Ortiz, Catalina Tovar, Jorge Negrete, Ernesto Arroyo, Camila González* ..... 265

Distribución geográfica de las especies de *Leishmania* en Colombia, 1985-2017
*Jussep Salgado-Almario, Carlos Arturo Hernández, Clemencia Ovalle-Bracho* ..... 278

El caseinato de sodio y la caseína α inhiben la proliferación de la línea celular mieloide de ratón 32D cl3 mediante el TNF-α
*Benny Weiss-Steider, Yolanda Córdova, Itzen Aguiñiga-Sánchez, Edgar Ledesma-Martínez, Vanihamin Domínguez-Melendez, Edelmiro Santiago-Osorio* ..... 291

El biomodelo porcino en la investigación médica traslacional: del biomodelo al humano en trasplante pulmonar
*Liliana Fernández-Trujillo, Mauricio Velázquez, Luz Fernanda Sua, Indira Cujiño, Martha Giraldo, Diego Medina, Mauricio Burbano, Germán Torres, Carlos Muñoz-Zuluaga, Leidys Gutiérrez-Martínez* ..... 300

Experiencia de un centro colombiano en el tratamiento endovascular de la hemorragia posparto que amenaza la vida
*María Fernanda Escobar, Jorge Guillermo Velásquez, Alejandra Holguín, Joselín Sánchez, Adriana Messa, Javier Andrés Carvajal, Albaro José Nieto* ..... 314

Autoría de regalo: una aproximación a su frecuencia en una revista peruana
*Jessica Hanae Zafra-Tanaka, Cristian Roca, Jorge Luis Cañari-Casaño, AnaVargas-Calla* ..... 323

Vigilancia por el laboratorio de la tuberculosis resistente en menores de 15 años, Colombia, 2010 a 2015
*Angie Zabaleta, Claudia Llerena, Angélica Valbuenaa* ..... 330

Tendencia de la mortalidad por suicidio en las áreas urbanas y rurales de Colombia, 1979-2014
*Pablo Chaparro-Narváez, Diana Díaz-Jiménez, Carlos Castañeda-Orjuela* ..... 339

Malaria grave en mujeres gestantes hospitalizadas entre el 2010 y el 2014 en el departamento de Antioquia, Colombia
*Alberto Tobón-Castaño, John Edison Betancur* ..... 354

*Angiostrongylus* (*Parastrongylus*) *cantonensis* en huéspedes intermediarios y definitivos en Ecuador, 2014-2017
*Luis Solórzano-Alava, Francisco Sánchez-Amador, Talía Valverde* ..... 370

Validación de la sexta edición del *Addiction Severity Index* (ASI-6) (ISA-6) en población clínica de Colombia
*Juan Pablo Zapata, Jenny García, César Augusto Arroyave, Juan Daniel Calderón, José Mario Gómez, Doris Jacqueline Buitrago, Angélica Aparicio, Daniel Camilo Aguirre* ..... 385

**Comunicación breve**

Primera caracterización molecular de *Leishmania infantum* en pacientes con leishmaniosis visceral de la Provincia de Misiones, Argentina
*Ricardo G. Díaz, Karina A. Salvatierra, Gustavo A Silva, Enrique J. Deschutter, Fernando J. Bornay-Llinares, Lucrecia Acosta* ..... 405

**Nota técnica**

Evaluación de un método de amplificación isotérmica mediado por bucle para la detección rápida del virus sincicial respiratorio en niños con infección respiratoria aguda
*Alfonso Bettin-Martínez, José Villareal-Camacho, Guillermo Cervantes-Acosta, Jorge Acosta-Reyes, Juliana Barbosa, Homero San Juan* ..... 415

# Contents

**Editorial**

Current situation and perspectives in the treatment of tegumentary leishmaniases in America
*Jaime Soto* ..... 237

**Case presentation**

Gastro-allergic anisakiasis: The first case reported in Colombia and a literature review
*John A. Patiño, Mario J. Olivera* ..... 241

Water-induced dermatosis: Aquagenic keratoderma. A case report
*Camila Montoya, Liza M. Arias, Mónica Salazar, Rodrigo Restrepo* ..... 247

**Original article**

Surveillance of phlebotomine fauna and *Didelphis marsupialis* (Didelphimorphia: Didelphidae) infection in an area highly endemic for visceral leishmaniasis in Colombia
*Marlon Mauricio Ardila, Lina Carrillo-Bonilla, Adriana Pabón, Sara M. Robledo* ..... 252

Detection of *Trypanosoma cruzi* strains circulating in Córdoba department (Colombia) isolated from triatomines (Hemiptera: Reduviidae) collected by the community
*Cielo León, Mario Iván Ortiz, Catalina Tovar, Jorge Negrete, Ernesto Arroyo, Camila González* ..... 265

Geographical distribution of *Leishmania* species in Colombia, 1985-2017
*Jussep Salgado-Almario, Carlos Arturo Hernández, Clemencia Ovalle-Bracho* ..... 278

Sodium caseinate and alfa-casein inhibit proliferation of the mouse myeloid cell line 32D cl3 via TNF-α
*Benny Weiss-Steider, Yolanda Córdova, Itzen Aguiñiga-Sánchez, Edgar Ledesma-Martínez, Vanihamin Domínguez-Melendez, Edelmiro Santiago-Osorio* ..... 291

The porcine biomodel in translational medical research: From biomodel to human lung transplantation
*Liliana Fernández-Trujillo, Mauricio Velázquez, Luz Fernanda Sua, Indira Cujiño, Martha Giraldo, Diego Medina, Mauricio Burbano, Germán Torres, Carlos Muñoz-Zuluaga, Leidys Gutiérrez-Martínez* ..... 300

Experience of a Colombian center in the endovascular management of lifethreatening postpartum hemorrhage
*María Fernanda Escobar, Jorge Guillermo Velásquez, Alejandra Holguín, Joselín Sánchez, Adriana Messa, Javier Andrés Carvajal, Albaro José Nieto* ..... 314

Gift authorship: An approach to its frequency in a Peruvian journal
*Jessica Hanae Zafra-Tanaka, Cristian Roca, Jorge Luis Cañari-Casaño, AnaVargas-Calla* ..... 323

Resistant tuberculosis in children under 15 years of age, Colombia 2010-2015
*Angie Zabaleta, Claudia Llerena, Angélica Valbuenaa* ..... 330

The trend in mortality due to suicide in urban and rural areas of Colombia, 1979-2014
*Pablo Chaparro-Narváez, Diana Díaz-Jiménez, Carlos Castañeda-Orjuela* ..... 339

Severe malaria in pregnant women hospitalized between 2010 and 2014 in the Department of Antioquia (Colombia)
*Alberto Tobón-Castaño, John Edison Betancur* ..... 354

*Angiostrongylus (Parastrongylus) cantonensis* on intermediate and definitive hosts in Ecuador, 2014-2017
*Luis Solórzano-Alava, Francisco Sánchez-Amador, Talía Valverde* ..... 370

Validation of the sixth version of the Addiction Severity Index (ASI-6) for patients in a clinical population of Colombia
*Juan Pablo Zapata, Jenny García, César Augusto Arroyave, Juan Daniel Calderón, José Mario Gómez, Doris Jacqueline Buitrago, Angélica Aparicio, Daniel Camilo Aguirre* ..... 385

**Brief communication**

First molecular characterization of *Leishmania infantum* species in patients infected with visceral leishmaniasis in Misiones province, Argentina
*Ricardo G. Díaz, Karina A. Salvatierra, Gustavo A Silva, Enrique J. Deschutter, Fernando J. Bornay-Llinares, Lucrecia Acosta* ..... 405

**Technical note**

Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of human respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection
*Alfonso Bettin-Martínez, José Villareal-Camacho, Guillermo Cervantes-Acosta, Jorge Acosta-Reyes, Juliana Barbosa, Homero San Juan* ..... 415

**Biomédica** Instituto Nacional de Salud

Volumen 39, No. 2 - Bogotá, D.C., Colombia - Junio de 2019

**Editorial**

# Situación actual y perspectivas en el tratamiento de las leishmaniasis tegumentarias en América

El tratamiento de las leishmaniasis tegumentarias enfrenta actualmente una situación compleja en América como consecuencia del uso consuetudinario de la monoterapia con antimoniales pentavalentes y la limitada disponibilidad de alternativas que ya han demostrado su eficacia y seguridad, pero no son accesibles. El aumento preocupante de las fallas terapéuticas, el incremento de los efectos adversos serios y la aparición de variantes clínicas atípicas, graves, extensas y recurrentes resalta la urgencia de contar con otras opciones de tratamiento. Hay varios medicamentos, algunos ya viejos, otros menos (anfotericina B y pentamidina), y los más o menos nuevos (miltefosina, paromomicina), que constituyen alternativas interesantes.

A continuación, comento brevemente algunas de las circunstancias por las cuales considero complejo el panorama.

## Problemas con el tratamiento actual

### *Eficacia y seguridad del medicamento disponible*

Los antimoniales pentavalentes han estado en uso por más de 70 años y continúan siendo la primera elección en muchos países, incluido Colombia. Y no es tanto por sus bondades sino, más bien, por la falta de otros medicamentos seguros y efectivos. Para compensar la reducción en las tasas de curación con estos compuestos, se incrementó la dosis, con lo que aumentaron los efectos adversos serios, obligando a dar marcha atrás en la dosis y poner un límite (3 ampollas=15 mg/kg/día aproximadamente).

### *Eficacia, seguridad y disponibilidad de las alternativas sistémicas*

La miltefosina, la pentamidina y la anfotericina B tienen una eficacia similar a la de los antimoniales pentavalentes. El perfil de seguridad de la miltefosina es mejor que el de estos y sus efectos adversos se limitan a alteraciones leves a moderadas del aparato gastrointestinal. Es el único medicamento oral disponible para el tratamiento de la leishmaniasis, lo cual facilita el tratamiento en niños. La pentamidina y la anfotericina B se administran parenteralmente. El volumen que se inyecta y el número de dosis de pentamidina establecidos son menores, lo que mejora el cumplimiento del tratamiento. Estos medicamentos apenas están siendo incluidos en las guías de manejo de algunos países y el principal inconveniente es su disponibilidad y su costo.

### *Variabilidad de resultados*

La eficacia de los antimoniales pentavalentes fluctúa entre 45 y 85 %. Esta variabilidad puede obedecer a muchas circunstancias, incluidas las diferencias en la sensibilidad de las especies de *Leishmania*, las diferencias presentes en

**Citación:**
Soto J. Situación actual y perspectivas en el tratamiento de las leishmaniasis tegumentarias en América. Biomédica. 2019;39:237-40

el huésped, el tipo de lesión, etc. Otro factor importante es la gran diversidad de los criterios incluidos en los protocolos de investigación y de manejo clínico para medir la eficacia. Todos estos aspectos dificultan el análisis de datos, el planteamiento de conclusiones y el diseño de guías únicas.

***Evidencia insuficiente***

La información obtenida de los pacientes atendidos en los hospitales de las zonas endémicas es incompleta y de mala calidad. Los seguimientos son cortos y más del 80 % de los pacientes no regresan a los controles, así que la evidencia sobre el resultado real del tratamiento es muy deficiente. Los ensayos clínicos publicados tienen insuficiencias metodológicas y carecen de uniformidad en las definiciones, las mediciones y los tiempos; además, los seguimientos en los protocolos de investigación son de 6 a 12 meses, lo que permite detectar recurrencias en el corto plazo, pero no las recidivas a largo plazo. La recomendación de hacer ensayos clínicos controlados en cada país con todos los medicamentos parece razonable, pero suena utópica en las circunstancias actuales y con los recursos disponibles.

**Problemas para desarrollar nuevos medicamentos**

En este sentido, debe mencionarse el escaso interés y los recursos limitados de las instituciones académicas y de los centros de investigación, cuya prioridad no son las leishmaniasis. Asimismo, es poco el interés de las casas farmacéuticas para desarrollar nuevos medicamentes contra la leishmaniasis, especialmente para la forma cutánea, en cuyo tratamiento es indispensable más de una modalidad terapéutica.

Por otra parte, las entidades gubernamentales reconocen las necesidades, pero no tienen los recursos ni la infraestructura para acometer el desarrollo de alternativas terapéuticas, a lo que se suma el que los enfermos de leishmaniasis no tienen poder ni peso político para convertirse en factores de presión que exijan la dotación de medicamentos y, menos aún, de fondos para la investigación. Además, no se cuenta con modelos preclínicos adecuados que permitan una tamización y una evaluación más precisa de la actividad de nuevos compuestos.

**Problemas con la atención de los enfermos**

Quienes sufren leishmaniasis, generalmente viven en zonas apartadas y con acceso limitado a los centros de atención médica. Son jornaleros o cultivan sus parcelas, de manera que si no trabajan no tienen ingresos. Para buscar asistencia médica deben dejar a su familia y su trabajo y viajar largas distancias, y todo ello por su propia cuenta y riesgo.

Asimismo, no existe un método diagnóstico simple, preciso, sensible, específico, seguro y económico, por lo que el paciente puede verse abocado a asistir varias veces al hospital para repetir el único examen disponible en el primer nivel de atención, o asumir los costos y las demoras propias de los exámenes más especializados. Usualmente, el enfermo debe ir al menos dos o tres veces al puesto de salud: a la consulta inicial, para recibir el resultado del examen y la prescripción del medicamento y, luego, para iniciarlo cuando llega, pues en muchos sitios es norma que se remita la solicitud del tratamiento una vez confirmado el diagnóstico, de suerte que podrían transcurrir de una a seis semanas entre la consulta y el inicio del tratamiento.

La atención de los enfermos con leishmaniasis usualmente está a cargo de profesionales de la salud recientemente egresados y sin experiencia en la enfermedad, pues ellos son los destinados a prestar el servicio social en las zonas endémicas. Estos profesionales tienen una alta rotación y no hay programas de educación y entrenamiento que los capaciten. Además, en algunos lugares, por ejemplo en Colombia, la atención es prestada por dos entidades distintas: una es responsable por el diagnóstico y otra por el tratamiento. Y no siempre hay buena coordinación entre ellas. Se suma a esto que los exámenes de control del tratamiento ordenados en las guías de manejo no siempre están disponibles en los sitios habituales de atención de los enfermos en el primer nivel, lo que retarda el tratamiento o lo encarece, ya que algunos pacientes asumen el costo para evitar más demoras.

**Perspectivas**

El problema con los medicamentos es importante, pero no necesariamente es el mayor. Temas como el diagnóstico preciso, el acceso a los servicios de salud y el seguimiento a largo plazo, también deben resolverse.

Todos los enfermos deben ser tratados, pero no todos tienen que recibir tratamiento sistémico. Debemos encontrar el método para determinar quiénes pueden ser tratados localmente, quiénes están en riesgo de que la enfermedad se agrave o se disemine, y quiénes pueden presentar complicaciones tardías para administrarles los medicamentos sistémicos más efectivos y seguros.

El uso de dos o más intervenciones terapéuticas simultáneas (medicamentos contra la leishmaniasis, medios físicos, inmunomodificadores) parece una opción lógica y se deben hacer más estudios para establecer cuáles son las más adecuadas, pensando en que los tratamientos combinados deben ser la norma desde el comienzo y no la alternativa cuando falla la monoterapia.

Por otra parte, el tratamiento local con cremas, medios físicos o inyecciones parece una opción razonable para la enfermedad limitada a la piel y se deben continuar los estudios clínicos para definir su uso.

Asimismo, el incremento de los casos de leishmaniasis cutánea en niños y mujeres obliga a buscar aproximaciones terapéuticas que sean efectivas, seguras y fáciles de administrar en esos grupos, en tanto que la limpieza, la eliminación de la costra, la humectación y la protección de la úlcera, deben ser parte integral y fundamental del manejo de la leishmaniasis cutánea.

Por otro lado, el tratamiento de los enfermos con leishmaniasis mucosa debe incluir el manejo de las secuelas, la recuperación de la función, la remodelación estética y la reparación de las relaciones sociales y familiares que pudieron haberse deteriorado como consecuencia de la enfermedad.

En otro sentido, la revisión y la actualización de las guías de manejo en cada país debe hacerse conjuntamente con representantes de la academia, de los centros de investigación, de las instituciones que manejan los enfermos y de los ministerios de salud, de suerte que se tengan en cuenta todos los puntos de vista y se tomen decisiones que sean útiles, aplicables, factibles y efectivas.

Hay que organizar un mecanismo para que los jóvenes profesionales encargados de la salud en las zonas endémicas puedan consultar en tiempo real con centros o personas expertas que les puedan ayudar a enfrentar aquellas situaciones particulares no contempladas en las guías de manejo, y que los orienten y acompañen en el manejo con los tratamientos aprobados, pero, también, para que tengan más seguridad en el momento de usar los nuevos medicamentos.

Asimismo, se debe diseñar un mecanismo efectivo de seguimiento de todos los enfermos que recibieron tratamiento para garantizar que fueron correctamente tratados y para obtener datos sobre los resultados a largo plazo que nos permitan establecer cifras reales sobre la efectividad de los diversos tratamientos.

Hubo una época en la que el proceso era simple: se hacía el diagnóstico y se administraban los antimoniales pentavalentes. Hoy la situación se ha vuelto más compleja, pues son muchos los factores que deben considerarse antes de administrar el tratamiento y son varias las opciones terapéuticas. Tenemos que superar la monoterapia –sea con el producto que sea– y plantear combinaciones seguras y efectivas, pero, sobre todo, que estén disponibles, pues es lamentable que hoy sepamos que la miltefosina oral, la paromomicina en crema, la pentamidina inyectable y la anfotericina B liposómica podrían resolver buena parte del problema, pero su acceso está restringido por las regulaciones o por los caprichos del mercado.

Jaime Soto
Fundación Nacional de Dermatología, FUNDERMA, Santa Cruz, Bolivia

**Lecturas recomendadas**

Chakravarty J, Sundar S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. Expert Opin Pharmacother. 2019;7:1-15. https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1609940

Hefnawy A, Berg M, Dujardin JC, De Muylder G. Exploiting knowledge on leishmania drug resistance to support the quest for new drugs. Trends Parasitol. 2017;33:162-174. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.003

Sampaio RNR, Silva JSFE, Paula CDR, Porto C, Motta JOCD, Pereira LIA, *et al*. A randomized, open-label clinical trial comparing the long-term effects of miltefosine and meglumine antimoniate for mucosal leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop. 2019;28;52:e20180292. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0292-2018

Machado GU, Prates FV, Machado PRL. Disseminated leishmaniasis: Clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. An Bras Dermatol. 2019;94:9-16. https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20198775

Sosa N, Pascale JM, Jiménez AI, Norwood JA, Kreishman-Detrick M, Weina PJ, *et al*. Topical paromomycin for New World cutaneous leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2019;2;13(5):e0007253. https://doi.org/ 10.1371/journal.pntd.0007253

Iranpour S, Hosseinzadeh A, Alipour A. Efficacy of miltefosine compared with glucantime for the treatment of cutaneous leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. Epidemiol Health. 2019;31:e2019011. https://doi.org/10.4178/epih.e2019011

**Editorial**

## Current situation and perspectives in the treatment of tegumentary leishmaniases in America

The treatment of tegumentary leishmaniasis faces a very complex situation in America as a consequence of the perennial use of pentavalent antimonials as monotherapy and the limited availability of alternatives whose efficacy and safety have been proven, but are not accessible. The worrying increase in therapeutic failures and serious adverse events and the emergence of atypical, severe, extensive, and recurrent clinical variants demand the search for other therapeutic options. There are several medications (amphotericin B, pentamidine, miltefosine and paromomycin) that are interesting alternatives.

### Problems with the current treatment

#### *Efficacy and safety of available drugs*

The pentavalent antimonials have been in use for over 70 years and they continue to be the first choice in many countries, including Colombia, which responds not so much to their benefits but, rather, to the lack of other safe and effective medicines. To compensate for the reduction in healing rates with pentavalent antimonials, the dose was increased (from 10 m/kg/day for 10 days to 20mg/kg/day during 20 or 30 days), with the consequent increase of serious adverse events, which forced to reverse the dose and put a limit (3 amps=15 mg/kg/day approximately).

#### *Efficiency, security, and availability of systemic alternatives*

Miltefosine, pentamidine, and amphotericin B have similar efficacy to pentavalent antimonials. The safety profile of miltefosine is better than that of these compounds and its adverse effects are limited to mild to moderate gastrointestinal symptoms. This is the only oral medication available for the treatment of leishmaniasis, which facilitates treatment in children. Pentamidine and amphotericin B are administered parenterally. The volume to be injected and the number of doses used with pentamidine is lower, which improves adherence. These medications are just being included in the management guidelines of some countries and the main inconveniences are their availability and cost.

#### *Variability of results*

The effectiveness of pentavalent antimonials is between 45 and 85%. This variability can be due to many circumstances including differences in susceptibility of the different *Leishmania* species, differences in the host, type of disease, etc. Another important factor is the wide diversity in the criteria to measure efficacy in research and clinical protocols. All these aspects make it difficult to analyze data, draw conclusions, and design unified guides.

#### *Insufficient evidence*

The information obtained from patients seen at hospitals in endemic areas is incomplete and of poor quality. The follow-ups are short and more than 80% of the patients do not return to control visits, so the evidence about the actual result of treatment is very poor. The published clinical trials have methodological deficiencies and lack of uniformity in definitions, measurements, and times. In addition, the follow-ups in research protocols are from 6 to 12 months, which allows detecting recurrences in the short term

**Citación:**
Soto J. Current situation and perspectives in the treatment of tegumentary leishmaniases in America. Biomédica. 2019;39:237-40

but not relapses in the long term. The recommendation to conduct controlled clinical trials in each country with all drugs seems reasonable but non-realistic given the circumstances and current resources.

**Problems for the development of new medications**

There are insufficient interest and limited resources in academic institutions and research centers that do not consider leishmaniasis a priority. Besides, the pharmaceutical companies show little interest to develop new anti-leishmanial drugs, especially for the tegumentary form of the disease, for which more than one therapeutic modality is indispensable. On the other hand, government institutions are aware of the needs but do not have the resources nor the infrastructure to undertake the development of therapeutic alternatives.

Also, the patients with leishmaniasis do not have the power or the political import to exert pressure and demand the provision of medicines and, even less, funds for research. Besides, the lack of adequate preclinical models that allow a more accurate screening and evaluation of the activity of new compounds is a problem as well.

**Problems with patient care**

The people affected by leishmaniasis generally live in remote areas with limited access to health care centers. They are day laborers or cultivate their own small farms, so if they do not work, they do not have an income. To seek medical assistance they must leave their family and work and travel long distances and all this at their own expenses.

Another difficulty is that there is no simple, accurate, safe and economical diagnostic method, so the patient may have to go to the hospital several times to repeat the only available test at this level or assume the costs and delays for more specialized exams. Patients usually have to go two or three times to the health post: first for the initial consultation, then to receive laboratory results and the prescription of the medication, and, finally, to start the treatment when the drug arrives because, in many places, medications are delivered only after the parasitological diagnosis is performed. Therefore, one to six weeks may elapse between the consultation and the start of the treatment.

The care of patients with leishmaniasis is usually provided by young health professionals with no experience in the disease since they are those sent to provide social service in endemic areas. These professionals have a high turnover and there are no education and training programs to teach them.

In some places, Colombia, for example, care is provided by two different entities: One is responsible for diagnosis and the other for treatment and not always there is good coordination between them.

Laboratory tests to control treatment according to official guidelines are not always available in the first level of health care, which is usually where leishmaniasis patients are seen, and this delays the treatment or makes it more expensive since some patients assume the cost to avoid further delays.

**Perspectives**

The problems related to the therapy are important, but not necessarily the most important. Issues such as accurate diagnosis, accessibility to health services, and long-term follow-up should also be resolved.

All patients must be treated but not all of them have to receive systemic treatment. We must find the method to identify those who can be treated locally versus those who need systemic therapy because they are at risk of developing more severe disease or of disseminating it or having late complications.

The use of two or more simultaneous therapeutic interventions (antileishmanial drugs, physical therapies, immunomodifiers) seems a logical option and more studies should be done to identify the most appropriate ones always in the idea that combined treatments should be the rule from the beginning and not the alternative when monotherapy fails. Local treatment with creams, physical measures or injections seems a reasonable option for a disease affecting the skin and clinical studies should be continued to refine its use.

The increase of cutaneous leishmaniasis in children and women forces us to look for effective, safe, and easy-to-administer therapeutic approaches in these groups. In addition, cleaning, moisturizing, and protecting the ulcer should be an integral and fundamental part of the management of cutaneous leishmaniasis.

The treatment of patients with mucosal leishmaniasis should include the management of sequelae, the recovery of function, the aesthetic remodeling, and the repair of social and family relationships that may have deteriorated as a result of the disease.

The revision and updating of the official guides in each country should be carried out jointly by representatives of the academy, research centers, and health care institutions, as well as the ministries of health, to consider all points of view and make useful, applicable, feasible, and effective decisions.

It is necessary to organize a mechanism to provide advice, counselling, and support in real time to those young professionals working in endemic areas through centers or experts that can help them face those particular situations out of official guidelines and guide them in the use of approved treatments but also in the use of new medicines when appropriate.

An effective follow-up mechanism must be designed for all the patients to ensure that they were correctly treated and, very important, to obtain long-term data results that allow us to establish real appraisal on the effectiveness of drugs.

There was a time when the process was simple: Diagnosis was made and pentavalent antimonials were administered. Today, the situation has become more complex because there are many factors to consider before administering treatment and several therapeutic options. We have to overcome the idea of monotherapy (whatever the product) and move to safe and effective combinations, but the drugs need to be available. It is unfortunate that we know today that oral miltefosine, paromomycin cream, injectable pentamidine, and liposomal amphotericin B could solve much of the problem, but access is restricted by regulations or market considerations.

Jaime Soto
Fundación Nacional de Dermatología, FUNDERMA, Santa Cruz, Bolivia

## Recommended readings

Chakravarty J, Sundar S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. Expert Opin Pharmacother. 2019;7:1-15. https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1609940

Hefnawy A, Berg M, Dujardin JC, De Muylder G. Exploiting knowledge on leishmania drug resistance to support the quest for new drugs. Trends Parasitol. 2017;33:162-74. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.003

Sampaio RNR, Silva JSFE, Paula CDR, Porto C, Motta JOCD, Pereira LIA, *et al*. A randomized, open-label clinical trial comparing the long-term effects of miltefosine and meglumine antimoniate for mucosal leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop. 2019;28;52:e20180292. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0292-2018

Machado GU, Prates FV, Machado PRL. Disseminated leishmaniasis: Clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. An Bras Dermatol. 2019;94:9-16. https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20198775

Sosa N, Pascale JM, Jiménez AI, Norwood JA, Kreishman-Detrick M, Weina PJ, *et al*. Topical paromomycin for New World cutaneous leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2019;2;13:e0007253. https://doi.org/ 10.1371/journal.pntd.0007253

Iranpour S, Hosseinzadeh A, Alipour A. Efficacy of miltefosine compared with glucantime for the treatment of cutaneous leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. Epidemiol Health. 2019;31:e2019011. https://doi.org/10.4178/epih.e2019011

Biomédica 2019;39:241-6
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.3936

Pesentación de caso

# Anisakiasis gastro-alérgica, primera descripción de un caso en Colombia y revisión bibliográfica

John A. Patiño[1], Mario J. Olivera[2]

[1] Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

La anisakiasis es una enfermedad parasitaria zoonótica causada por el consumo de pescados o mariscos crudos o poco cocidos infectados con nematodos de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum*.
Se describe el primer caso de anisakiasis en Colombia y se resume la literatura médica disponible. Una mujer de 52 años de edad consultó por dolor epigástrico agudo de inicio abrupto, náuseas, vómitos, diarrea y urticaria después de consumir pescado.
El examen físico reveló sensibilidad moderada en el epigastrio. El examen de laboratorio evidenció leucocitosis, en tanto que la radiografía simple y el electrocardiograma no reflejaron ninguna anormalidad. El diagnóstico se hizo mediante una endoscopia de vías digestivas altas, la cual reveló engrosamiento de la pared gástrica y un parásito en movimiento. Se encontró una larva de *Anisakis* y se la extrajo por endoscopia, lo que alivió el dolor de la paciente.
Clínicamente, la anisakiasis puede presentarse como una enfermedad gástrica, intestinal, en otros sistemas o alérgica. El diagnóstico se hace con base en la elaboración del historial alimentario del paciente y la visualización directa de las larvas; el único tratamiento efectivo consiste en su extracción endoscópica.

**Palabras clave:** *Anisakis*; nematodos; enfermedades transmitidas por alimentos; hipersensibilidad; enfermedades gastrointestinales; Colombia.

**Gastro-allergic anisakiasis: The first case reported in Colombia and a literature review**

Anisakiasis is a zoonotic parasitic disease caused by consumption of raw or undercooked fish or seafood infected with nematodes of the *Anisakis, Pseudoterranova* or *Contracaecum* genera.
Here, we describe the first case of anisakiasis in Colombia and summarize the available literature. A 52-year-old female with a history of abrupt-onset sharp epigastric pain, nausea, vomit, diarrhea, and urticaria following fish consumption consulted the health service.
The physical examination revealed moderate tenderness of the epigastric region; the laboratory evaluation showed leukocytosis and a simple X-ray and ECG showed no abnormalities. The diagnosis was made by endoscopic examination, which revealed a thickened gastric wall and a moving larval worm. An *Anisakis* larva was found and extracted endoscopically, which relieved the pain of the patient.
Clinically, anisakiasis may present as a gastric, intestinal, extragastrointestinal or allergic disease. Diagnosis and treatment of anisakiasis are made by a dietary history, direct visualization and endoscopic extraction of possible larvae, which is the only effective therapy.

**Keywords:** *Anisakis*; nematoda; foodborne diseases; hypersensitivity; gastrointestinal diseases; Colombia.

La anisakiasis, reportada por primera vez en Holanda en 1955 por van Thiel (1), es una zoonosis accidental causada por la ingestión de pescado crudo o poco cocido infestado con larvas infectivas en estadio L3 del nematodo *Anisakis simplex*.

Se trata de una enfermedad cosmopolita que tiene mayor incidencia en aquellas regiones donde el pescado crudo hace parte de la gastronomía, como sucede en los países asiáticos. Sin embargo, debido a la expansión de este tipo de preparaciones, es posible encontrarla en muchos otros lugares. Además, la infestación puede aparecer por el consumo de pescados con cocción o refrigeración deficiente. Se presenta el primer reporte de este parásito en humanos en Colombia.

**Recibido:** 01/08/17
**Aceptado:** 03/09/18
**Publicado:** 04/09/18

**Citación:**
Patiño JA, Olivera MJ. Anisakiasis gastro-alérgica, primera descripción de un caso en Colombia y revisión bibliográfica. Biomédica. 2019;39:241-6. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.3936

**Correspondencia:**
Mario J. Olivera, Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (51) 220 7700, extensión 12 23
moliverajr@gmail.com

**Contribución de los autores:**
John A. Patiño: recolección de datos y discusión de los hallazgos clínicos
Mario J. Olivera: concepción y diseño del manuscrito, y manejo clínico del paciente
Ambos autores participaron en el análisis y la interpretación de los datos, y la redacción del manuscrito.

**Financiación:**
Para la realización de este trabajo no se requirió financiación.

**Conflicto de intereses:**
Los autores declaramos que no existió ningún tipo de conflicto de intereses en la realización del presente trabajo.

***Presentación del caso***

Se trata de una profesora de 52 años de edad procedente de Bogotá, que presentó un cuadro clínico de dos días de evolución consistente en epigastralgia intensa, náuseas, vómitos y diarrea, así como inapetencia y urticaria. No presentó fiebre.

La paciente refirió que los síntomas se habían iniciado después de ingerir alimentos a base de pescado crudo en una zona costera del departamento de Córdoba, Colombia. En su caso, el consumo de pescado crudo era tradición familiar.

En el examen físico se evidenció palidez mucocutánea generalizada y dolor en el mesogastrio con la palpación. Se le hizo un hemograma en el que se evidenció leucocitosis con neutrofilia y eosinofilia. En el electrocardiograma y la radiografía de tórax, no se observaron alteraciones. La endoscopia de vías digestivas altas permitió detectar un verme móvil, serpenteante, con un extremo aferrado a la mucosa del antro; el área alrededor estaba edematosa y eritematosa.

El verme se extrajo y se fijó en glutaraldehído para luego ser enviado al Instituto Nacional de Salud, en donde se hizo el análisis parasitológico. En este se describió una larva de *A. simplex* (*s.l.*) de 35 mm de longitud y 0,6 mm de ancho, de color blanco, con tres labios bilobulados en la región cefálica, un diente perforador ventral, glándulas excretoras anteriores, estómago largo, sin ciego, y cola terminada en punta roma. El resultado del coprocultivo ordenado fue normal.

La paciente refirió mejoría de la sintomatología gastrointestinal y alérgica después de la extracción del parásito. A pesar de que el resultado del coprocultivo fue negativo para parasitosis, se consideró necesario administrar una dosis única de 400 mg de albendazol.

**Discusión**

El término ‘anisakiasis’ se refiere a la infestación por *A. simplex* (*s.l.*), aunque también se utiliza el término “anisakidosis” para referirse a la producida por diferentes especies de la familia Anisakidae, como *Pseudoterranova decipiens* (*s.l.*), *Contracaecum osculatum* (*s.l.*) y *A. simplex* (*s.l.*); estos dos términos conviven en la literatura especializada de forma indistinta (2).

Los ejemplares adultos de *A. simplex* (*s.l.*) miden de 2 a 3 cm de largo por 1 cm de diámetro, y se encuentran normalmente en cetáceos (ballenas y delfines), en cuyo interior alcanzan la madurez sexual adheridos a la mucosa gastrointestinal y luego expulsan los huevos sin embrión, los cuales alcanzan el agua junto con las heces de sus huéspedes.

Una vez en el agua, se forman los embriones y las larvas evolucionan hasta el estadio L2, caracterizado por ser de vida libre. Posteriormente, las larvas son ingeridas por crustáceos (principalmente copépodos y eufausiáceos), en los cuales pasan al estadio L3 y adoptan la forma infectiva para peces y calamares.

En estos, que actúan como huéspedes paraténicos o de transporte, las larvas L3 migran del intestino hacia los tejidos de la cavidad peritoneal y crecen hasta 3 cm de largo y son infectivas. También, pueden migrar al tejido muscular, enquistarse, permanecer en estado latente y pasar de pez en pez

mediante la depredación. Cuando los mamíferos marinos ingieren estos peces o calamares infestados con larvas L3 estas mudan dos veces, se convierten en parásitos adultos y producen huevos que se esparcen en el agua (3,4).

El ser humano se infesta cuando consume peces con larvas L3, sin la debida congelación o cocción (figura 1). El equivalente de la anisakiasis en peces es la ascariasis o ascaridiasis (5).

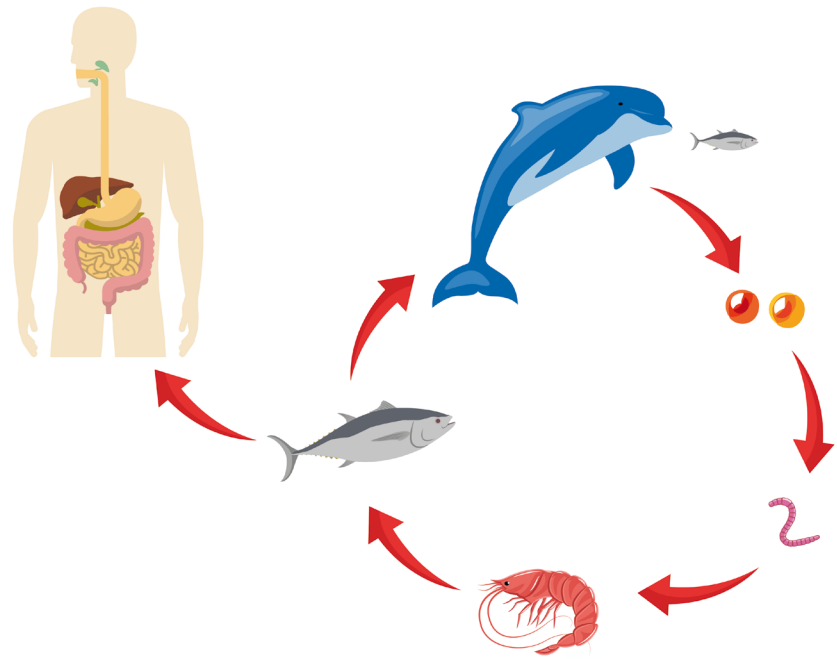


**Figura 1.** Esquema del ciclo biológico de *Anisakis simplex*

En su etapa de adulto, *Anisakis simplex* parasita una gran variedad de mamíferos marinos, incrustándose en la mucosa del estómago. Los huevos sin embrión son expulsados por las hembras adultas y llegan al medio marino con las heces de los huéspedes definitivos.

Dentro del huevo se desarrollan la primera (L1) y la segunda etapas larvarias (L2), luego eclosionan y producen larvas de vida libre que son ingeridas por los crustáceos (huésped intermediario). Las larvas ingeridas se convierten en larvas L3, las cuales son infectivas para peces y calamares (huéspedes paraténicos). Las larvas migran del intestino a los tejidos de la cavidad peritoneal y crecen hasta los 3 cm de longitud. Tras la muerte del huésped, las larvas migran a sus tejidos musculares y se transfieren de un pez a otro. El ciclo vital se completa cuando un mamífero marino (cetáceo) se alimenta de un animal infestado. Los seres humanos se infestan accidentalmente cuando ingieren pescado crudo o poco cocinado. Después de la ingestión, las larvas de *Anisakis* penetran la mucosa gástrica e intestinal y causan los síntomas de la anisakiasis.

Una vez ingeridas las larvas L3, se producen las manifestaciones clínicas mediante dos mecanismos: el primero es la hipersensibilidad inmediata mediada por IgE frente a los antígenos de *A. simplex*, entre ellos los somáticos, los de excreción y los de secreción, los cuticulares y los del fluido seudocelómico. El segundo mecanismo es el daño directo causado por el nematodo en el segmento del tubo digestivo donde se asienta (6).

Las reacciones alérgicas pueden ir desde urticaria, angioedema o broncoespasmo, hasta la anafilaxia. El efecto local se presenta como dolor abdominal leve a intenso, náuseas, vómitos o diarrea que, en algunos casos, conducen a la expulsión natural del parásito (7,8). Además, se ha estimado que, aproximadamente, un tercio de los nematodos ingeridos puede afectar sistemas distintos al gastrointestinal al perforar la pared del tubo digestivo y migrar a otras localizaciones, como la mucosa esofágica y la orofaríngea, la cavidad abdominal, el epiplón mayor y el mesenterio (4).

Asimismo, se ha señalado que esta parasitosis es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gastrointestinal debido a la inflamación crónica y al posible efecto cancerígeno de ciertas secreciones parasitarias; además, se han reportado hallazgos incidentales de la larva en tumores gastrointestinales (9,10).

Los síntomas de la anisakiasis son variados e inespecíficos, por lo cual en muchos países no se diagnostica oportunamente. En nuestro medio, esta parasitosis no suele reconocerse, lo que puede aumentar el subdiagnóstico. En 1967, en un estudio clínico-patológico de 92 casos de anisakiasis en Japón, se reportó que más del 60 % de ellos se diagnosticaron como hallazgo quirúrgico durante intervenciones por apendicitis, abdomen agudo, tumor gástrico o cáncer, ileítis, colecistitis o diverticulitis, entre otras (11). Aún hoy, la anisakiasis sigue siendo comúnmente diagnosticada como apendicitis o enfermedad de Crohn (12).

El diagnóstico se presume a partir de la sintomatología y el antecedente de haber consumido pescado crudo o poco cocido, y se confirma mediante la endoscopia digestiva, que es la herramienta más útil, ya que permite la visualización directa de las larvas en el tubo digestivo y, además, facilita su cuantificación para extraerlas todas.

Existen otros medios diagnósticos, como la medición de los niveles de IgE total, los cuales aumentan debido a los mecanismos de hipersensibilidad dependientes de IgE que se ponen en marcha con la infestación. No obstante, esta prueba no es específica, ya que son varias las causas que pueden desencadenar los síntomas y elevar la concentración de IgE total. También, existe la posibilidad de medir los niveles específicos de IgE contra antígenos propios de los parásitos mediante ELISA, pero este método no está disponible comercialmente en Colombia. Es frecuente encontrar en el hemograma leucocitosis con neutrofilia y eosinofilia (13).

El tratamiento consiste en remover las larvas durante la endoscopia gastrointestinal, lo cual alivia los síntomas en pocos días (13-15). En algunos casos, cuando los vermes se localizan por fuera del tubo digestivo, se puede requerir tratamiento quirúrgico para extraerlos. El manejo de los síntomas de hipersensibilidad es el mismo que el de otras alergias, es decir, con antihistamínicos o glucocorticoides.

En casi todos los mares del mundo se ha reportado la presencia de larvas de *A. simplex* (*s.l.*) en las piezas capturadas; la parasitación en peces afecta entre el 40 y el 80 % de los especímenes, dependiendo de la especie del pez y de su procedencia (16). Pardo, *et al.*, demostraron que la prevalencia de la parasitosis con nematodos del género *Contracaecum* era mayor del 95 % en los peces rubios de los ríos Sinú y San Jorge en Colombia (17). También, se ha demostrado la presencia de peces parasitados por este nematodo en otros lugares del país (18-20), por lo cual la probabilidad de que la infestación humana se presente es alta.

La anisakiasis se puede prevenir asegurando la congelación a -20 °C de los pescados durante un periodo mínimo de 24 horas o su cocción a 60 °C durante 10 minutos. El número de casos de infestación en los Países Bajos se redujo casi a cero con la inclusión de estas medidas en la legislación (21).

Después de una búsqueda de artículos sobre la anisakiasis humana en Colombia, se pudo determinar que este es el primer caso diagnosticado. Hay que concienciar y divulgar información sobre esta enfermedad, para que se pueda diagnosticar y tratar exitosamente.

## Conclusiones

Este es el primer reporte de anisakiasis humana en Colombia y pone de manifiesto la necesidad de ampliar el estudio de este tipo de enfermedades. La anisakiasis se presenta con diversos síntomas poco específicos, lo que dificulta una rápida impresión diagnóstica que conduzca a su detección, por lo que los hallazgos son incidentales. El antecedente de haber consumido pescado crudo o poco cocido es importante para sospecharla. La implementación de medidas para el manejo del pescado antes de su consumo puede prevenir la infestación con estos parásitos.

## Referencias


1. Valls A, Pascual CY, Martín-Esteban M. Anisakis y anisakiosis. Allergol Immunopathol (Madr). 2003;31:348-55. https://doi.org/10.1016/S0301-0546(03)79211-8
2. Baird FJ, Gasser RB, Jabbar A, Lopata AL. Foodborne anisakiasis and allergy. Mol Cell Probes. 2014;28:167-74. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.02.003
3. Centers for Disease Control and Prevention. Anisakiasis. Fecha de consulta: 10 de abril de 2017. Disponible en: https://www.cdc.gov/parasites/anisakiasis/biology.html
4. Mattiucci S, Cipriani P, Paoletti M, Levsen A, Nascetti G. Reviewing biodiversity and epidemiological aspects of anisakid nematodes from the North-east Atlantic Ocean. J Helminthol. 2017;91:422-39. https://doi.org/10.1017/S0022149X1700027X
5. Hochberg NS, Hamer DH. Anisakidosis: Perils of the deep. Clin Infect Dis. 2010;51:806-12. https://doi.org/10.1086/656238
6. López D, Ramírez LM, del Rosal R, López F, Fernández-Crehuet R, Miño G. Anisakiasis in Spain: An increasing disease. Gastroenterol Hepatol. 2000;23:307-11.
7. Nieuwenhuizen NE, Lopata AL. Allergic reactions to *Anisakis* found in fish. Curr Allergy Asthma Rep. 2014;14:455. https://doi.org/10.1007/s11882-014-0455-3
8. Shimamura Y, Muwanwella N, Chandran S, Kandel G, Marcon N. Common symptoms from an uncommon infection: Gastrointestinal anisakiasis. Can J Gastroenterol Hepatol. 2016;2016:5176502. https://doi.org/10.1155/2016/5176502
9. García-Pérez JC, Rodríguez-Pérez R, Ballestero A, Zuloaga J, Fernández-Puntero B, Arias-Díaz J, *et al.* Previous exposure to the fish parasite *Anisakis* as a potential risk factor for gastric or colon adenocarcinoma. Medicine. 2015;94:e1699. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001699
10. Sonoda H, Yamamoto K, Ozeki K, Inoye H, Toda S, Maehara Y. An *Anisakis* larva attached to early gastric cancer: Report of a case. Surg Today. 2015;45:1321-5. https://doi.org/10.1007/s00595-014-1012-3
11. Yokogawa M, Yoshimura H. Clinicopathologic studies on larval anisakiasis in Japan. Am J Trop Med Hyg. 1967;16:723-8. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1967.16.723
12. Montalto M, Miele L, Marcheggiano A, Santoro L, Curigliano V, Vastola M, *et al. Anisakis* infestation: A case of acute abdomen mimicking Crohn's disease and eosinophilic gastroenteritis. Dig Liver Dis. 2005;37:62-4. https://doi.org/10.1016/j.dld.2004.05.014
13. Barriga J, Salazar F, Barriga E. Anisakiasis: presentación de un caso y revisión de la literatura. Rev Gastroenterol Perú. 1999;19:317-23.
14. Henríquez A, Villafruela M. Anisakis: pasado, presente y futuro. Med Clin. 2009;132:400-3. https://doi.org/10.1016/j.medcli.2008.11.022
15. Fuchizaki U, Nishikawa M. Gastric anisakiasis. N Engl J Med. 2016;375:e11. https://doi.org/10.1056/NEJMicm1509451
16. Colombo F, Cattaneo P, Castelletti M, Bernardi C. Prevalence and mean intensity of *Anisakidae* parasite in seafood caught in the Mediterranean sea focusing on fish species at risk of being raw-consumed. A meta-analysis and systematic review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2016;56:1405-16. https://doi.org/10.1080/10408398.2012.755947
17. Pardo CS, Mejía PK, Navarro VY, Atencio GV. Prevalencia y abundancia de *Contracaecum* sp. en rubio *Salminus affinis* en el río Sinú y San Jorge: descripción morfológica. Rev MVZ Córdoba. 2007;12:887-96. https://doi.org/10.21897/rmvz.433

18. Olivero-Verbel J, Baldiris-Avila R, Arroyo-Salgado B. Nematode infection in *Mugil incilis* (Lisa) from Cartagena Bay and Totumo Marsh, north of Colombia. J Parasitol. 2005;91:1109-12. https://doi.org/10.1645/GE-392R1.1

19. Castellanos JA, Tangua AR, Salazar L. Anisakidae nematodes isolated from the flathead grey mullet fish (*Mugil cephalus*) of Buenaventura, Colombia. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2017;6:265-70. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.08.001

20. Olivero-Verbel J, Baldiris-Ávila R, Güette-Fernández J, Benavides-Álvarez A, Mercado-Camargo J, Arroyo-Salgado B. *Contracaecum* sp. infection in *Hoplias malabaricus (*moncholo) from rivers and marshes of Colombia. Vet Parasitol. 2006;140:90-7. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.014

21. Nieuwenhuizen NE, Lopata AL. Allergic reactions to *Anisakis* found in fish. Curr Allergy Asthma Rep. 2014;14:455. https://doi.org/10.1007/s11882-014-0455-3.

Biomédica 2019;39:247-51
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.4524

Presentación de caso

# Dermatosis inducida por el agua: queratodermia acuagénica, a propósito de un caso

Camila Montoya, Liza M. Arias, Mónica Salazar, Rodrigo Restrepo

Programa de Dermatopatología, Universidad CES, Medellín, Colombia

La queratodermia acuagénica es una entidad benigna, caracterizada por producir pápulas blanquecinas o traslúcidas pocos segundos después del contacto con el agua.
Se presenta el caso de una paciente de 16 años de edad con aparición de múltiples pápulas confluentes y asintomáticas en ambas palmas al contacto con el agua, que desaparecían luego del secado. En el estudio de histopatología se observó dilatación de los conductos ecrinos y cambios en el estrato córneo.
Esta rara condición de etiología desconocida se ha relacionado con disfunción neuronal, alteraciones de las glándulas ecrinas y, más recientemente, con alteraciones en las acuaporinas. Se puede diagnosticar con una prueba semiológica sencilla llamada 'la mano en el balde'; la sospecha clínica es fundamental para hacer el diagnóstico, ya que los hallazgos histopatológicos pueden ser sutiles e inespecíficos. El tratamiento tópico incluye mecanismos de barrera y la toxina botulínica.

**Palabras clave:** enfermedades de la piel; queratodermia palmoplantar; agua; informes de casos.

**Water-induced dermatosis: Aquagenic keratoderma. A case report**

Aquagenic keratoderma is a benign entity that is characterized by producing whitish or translucent papules a few seconds after contact with water.
We present the case of a 16-year-old patient with multiple asymptomatic confluent papules that appeared on both hand palms after contact with water and which disappeared after drying. The histopathological findings in a skin biopsy after water exposure showed changes in the superficial layers of the stratum corneum and dilatation of sweat gland ducts.
This entity of unknown etiology has been related to neuronal and eccrine gland dysfunction. Recently it has been associated with alterations of aquaporins. The "hand-in-the-bucket" sign is a simple useful clinical tool for diagnosis, as histopathological findings may be nonspecific. Topical treatments include barrier mechanisms and botulinum toxin.

**Keywords:** Skin diseases; keratoderma, palmoplantar; water; case reports.

La queratodermia acuagénica es una entidad poco frecuente descrita por primera vez como 'acroqueratoderma papular translúcida transitoria' por English y McCollough en 1996 (1); se caracteriza por producir pápulas blanquecinas o traslúcidas pocos segundos después del contacto con el agua (2-4).

La finalidad de esta comunicación es agregar un caso más a la literatura de esta enfermedad inusual que, hasta donde lo hemos podido comprobar, es el primer caso reportado en Colombia. Asimismo, hacer una revisión breve de la literatura científica.

## Caso clínico

Se presenta el caso de una paciente de 16 años de edad con un cuadro clínico de un año de evolución, caracterizado por la aparición de múltiples pápulas traslúcidas y confluentes en ambas palmas luego de pocos minutos de tener contacto con el agua (figuras 1 y 2). Las lesiones eran asintomáticas y desaparecían por completo después del secado mecánico de las manos (figura 3). La paciente refirió no haber consumido ningún medicamento y negó tener enfermedades de base.

Se le tomó una biopsia de piel de la palma inmediatamente después del contacto con el agua. El estudio histopatológico reveló la presencia de piel distal (acral) con hiperqueratosis y áreas basofílicas en el estrato córneo, asociadas con dilatación de los conductos ecrinos (figura 4). Con estos hallazgos y los antecedentes clínicos, se hizo el diagnóstico de queratodermia acuagénica.

**Recibido:** 25/05/18
**Aceptado:** 11/09/18
**Publicado:** 12/09/18

**Citación:**
Montoya C, Arias LM, Salazar M, Restrepo R. Dermatosis inducida por el agua: queratodermia acuagénica, a propósito de un caso. Biomédica. 2019;39:247-51.
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.4524

**Correspondencia:**
Camila Montoya, Calle 7 N° 39-290, consultorio 911-912, Medellín, Colombia
Teléfono: (+574) 444 7310
camilamontoyabueno@gmail.com

**Contribución de los autores:**
Todos los autores contribuyeron en la concepción y el diseño, la adquisición, el análisis y la interpretación de los datos, y la redacción del manuscrito.

**Financiación:**
Para la elaboración de este manuscrito, no hubo fuente de financiación.

**Conflicto de intereses:**
Los autores declaramos no tener conflicto de intereses.

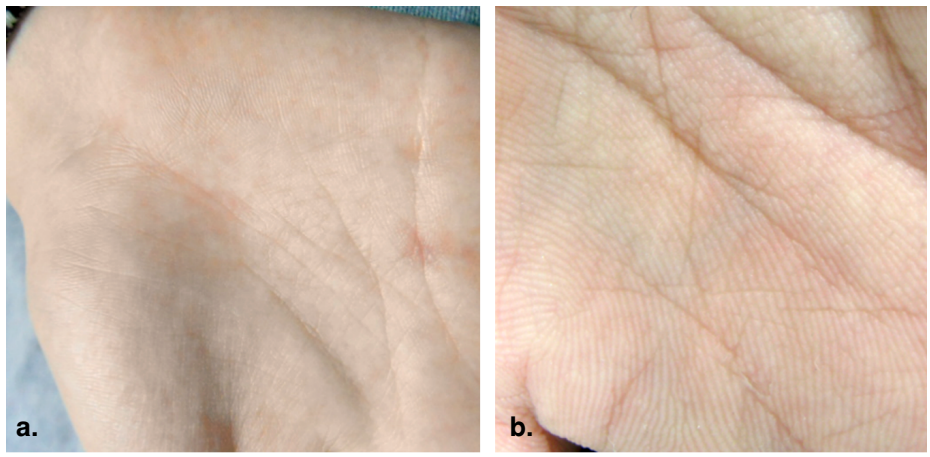



**Figura 1.** Palma de la mano derecha: **a)** antes del contacto con el agua: discreta prominencia de los surcos y crestas; **b)** acercamiento minutos después del secado: ausencia de lesiones palmares

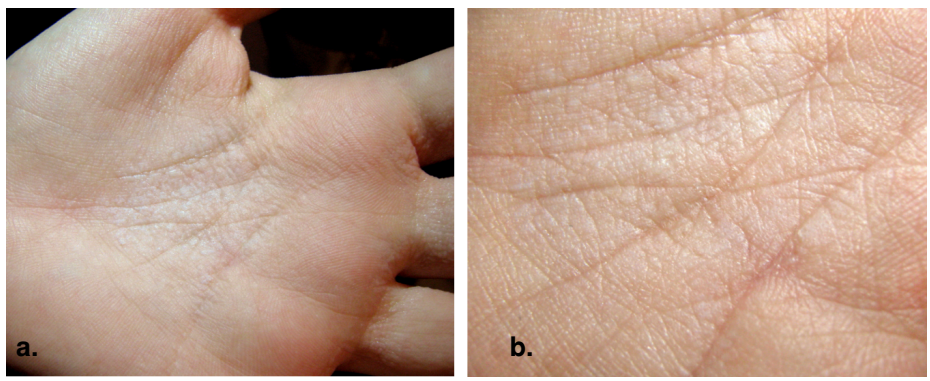



**Figura 2.** Palma de la mano izquierda: **a)** después del contacto con el agua se observan pápulas translúcidas confluentes con tendencia a la formación de placas; **b)** acercamiento de las mismas lesiones



**Figura 3.** Palma de la mano después del secado: ausencia de lesiones palmares

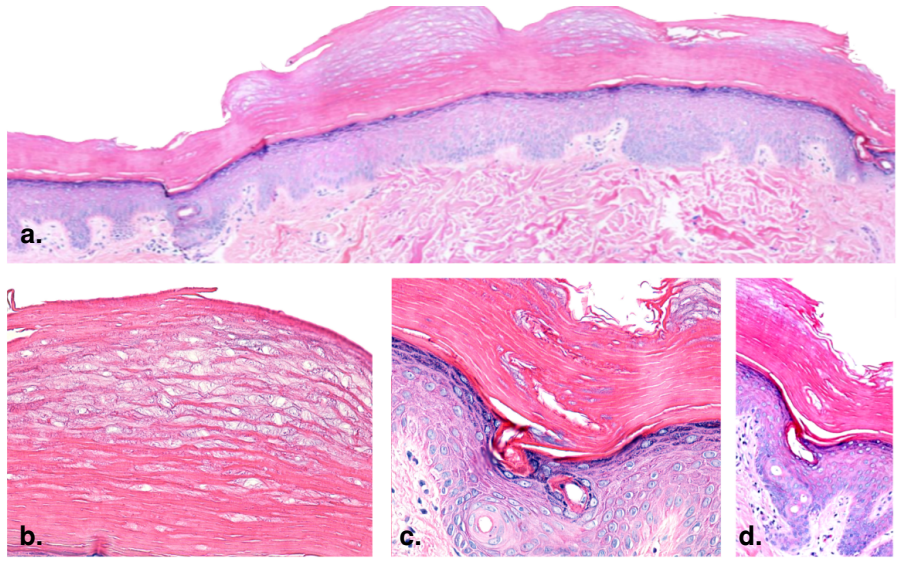



**Figura 4. a)** Vista panorámica: alteración de la tinción del estrato córneo y dilatación focal de los conductos ecrinos. Hematoxilina y eosina, 2X. **b)** Tinción basofílica del estrato córneo. Hematoxilina y eosina, 40X. **c)** y **d)** Dilatación de los conductos ecrinos. Hematoxilina y eosina, 10X y 4X

## Discusión

La queratodermia acuagénica se describió inicialmente en 1996 (1) y, aunque es infrecuente, el número de casos reportados ha ido en aumento. Esto lleva a pensar que esta entidad ha sido subdiagnosticada y su incidencia es mayor de la esperada. Debido a su particular relación con el agua, la sospecha clínica es fundamental para el diagnóstico. Una prueba semiológica sencilla llamada 'la mano en el balde' (5) y los antecedentes clínicos permiten orientar el diagnóstico.

Las mujeres se ven más frecuentemente afectadas. El rango etario es variable, sin embargo, su presentación en la infancia es rara (6). Usualmente, compromete las palmas, los dedos de las manos y, menos frecuentemente, las plantas de los pies (7); el compromiso bilateral es más característico. Se han reportados casos con características atípicas, como distribución unilateral (8) y presentación en el sexo masculino, y de localizaciones inusuales, como el dorso de las manos (9) y el dorso nasal (10). La mayoría de los casos son esporádicos, aunque se han descrito casos familiares (11).

La característica clínica principal es la inducción de lesiones después del contacto con el agua durante algunos minutos (en promedio, tres minutos) (10). Los pacientes presentan múltiples pápulas blanquecinas o translúcidas que pueden confluir, dando lugar a placas edematosas de aspecto macerado que, habitualmente, se ubican en el borde marginal de las palmas y desaparecen minutos después del secado (3). Por lo general, estas lesiones son asintomáticas y, con menor frecuencia, se asocian a ardor, dolor o prurito (3). La hiperhidrosis es un hallazgo frecuente en estos pacientes y, al mismo tiempo, actúa como un factor desencadenante (3,7,10).

La etiología de la queratodermia acuagénica sigue siendo desconocida, pero se han postulado varias hipótesis sobre causas probables, entre ellas, disfunción neuronal, hiperhidrosis, alteración de la osmolaridad y la concentración de sal en el estrato córneo, disfunción de los conductos

ecrinos y obstrucción del *ostium* (7). Más recientemente, se ha descrito su relación con alteraciones en las acuaporinas, específicamente la AQ-5 (12). La asociación descrita entre queratodermia acuagénica y fibrosis quística (13) podría sugerir que existe una fuerte relación entre la exposición a concentraciones anormales de sal en la epidermis y la patogenia de esta entidad (14). Esto también podría explicar la aparición de lesiones similares que se relacionan con el consumo de inhibidores de la COX-2 (15), aminoglucósidos y espironolactona (10).

La biopsia siempre debe tomarse después de la exposición al agua; sin embargo, los hallazgos histopatológicos pueden ser sutiles e, incluso, estar ausentes (16), por lo cual pueden pasar desapercibidos fuera del contexto clínico. La dilatación de los conductos ecrinos es el hallazgo más frecuente, tal como se observó en este caso, pero también pueden verse alteraciones de los acinos ecrinos, con hiperplasia, aspecto granular del citoplasma (16,17), cambios en las células claras (7), núcleos picnóticos y eosinofilia. El estrato córneo puede presentar hiperqueratosis, edema, tinción anormal o pálida y dilatación de los acrosiringios (7,17). Con menor frecuencia, se ha descrito hiperplasia de los acrosiringios, incluso con formación de proyecciones papilares (10), espongiosis de los conductos ecrinos, acantosis de la epidermis e infiltrado linfocitario dérmico (16).

El principal diagnóstico diferencial clínico e histológico es la acroqueratodermia pápulo-traslúcida hereditaria, la cual se caracteriza por lesiones palmares permanentes que se intensifican al entrar en contacto con el agua, como ocurre en la queratodermia acuagénica, pero, a diferencia de esta, no desaparecen al secarse la piel. Histológicamente, se presenta alteración del estrato córneo con hiperqueratosis, hipergranulosis y acantosis, en ausencia de compromiso de los conductos y acinos ecrinos (5).

Aunque la queratodermia acuagénica es una entidad benigna, puede alterar la calidad de vida del paciente. El tratamiento incluye la utilización de mecanismos de barrera, como el sulfuro de petróleo y el cloruro de aluminio. Existen casos reportados con buena respuesta a la toxina botulínica (8) y a la iontoforesis (18), lo que estaría a favor del rol principal de las glándulas sudoríparas en la patogenia de esta enfermedad.

En conclusión, esta entidad es una dermatosis transitoria inducida por el agua, de etiología desconocida, que puede diagnosticarse con una prueba semiológica sencilla, siendo la sospecha clínica fundamental para su diagnóstico. La biopsia debe tomarse únicamente después de que el paciente haya tenido contacto con el agua (17). Dado que los hallazgos histopatológicos pueden ser sutiles o inespecíficos, los antecedentes y la correlación clínico-patológica son imprescindibles para el diagnóstico.

## Referencias

1. English JC, McCollough ML. Transient reactive papulotranslucent acrokeratoderma. J Am Acad Dermatol. 1996;34:686-7. https://doi.org/10.1016/S0190-9622(96)80087-9
2. Tchernev G, Semkova K, Cardoso JC, Ananiev JJ, Wollina U. Aquagenic keratoderma. Two new case reports and a new hypothesis. Indian Dermatol Online J. 2014;5:30-3. https://doi.org/10.4103/2229-5178.126025
3. Ertürk-Özdemir E, Özcan D, Seçkin D. Acquired aquagenic syringeal acrokeratoderma: A case series of 10 patients. Australas J Dermatol. 2015;56:e43-5. https://doi.org/10.1111/ajd.12122
4. Lafuente-Urrez RF, Pérez-Pelegay J, Corredera-Carrión C. Queratodermia acuagénica: aportación de dos nuevos casos. Piel. 2014;29:60-2. https://doi.org/10.1016/j.piel.2013.06.003

5. Yan AC, Aasi SZ, Alms WJ, James WD, Heymann WR, Paller AS, *et al*. Aquagenic palmoplantar keratoderma. J Am Acad Dermatol. 2001;44:696-9. https://doi.org/10.1067/mjd.2001.113479
6. Qing X. Aquagenic acrokeratoderma: Case report with no involvement of the palms. Int J Dermatol. 2012;51:1388-403. https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04803.x
7. Rongioletti F, Tomasini C, Crovato F, Marchesi L. Aquagenic (pseudo) keratoderma: A clinical series with new pathological insights. Br J Dermatol. 2012;167:575-82. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.11003.x
8. Houle M-C, Al Dhaybi R, Benohanian A. Unilateral aquagenic keratoderma treated with botulinum toxin A. J Dermatol Case Rep. 2010;4:1-5. https://doi.org/10.3315/jdcr.2010.1045
9. Pardo J, Sánchez-Motilla JM, Latasa JM. Queratodermia acuagénica de características atípicas. Actas Dermosifiliogr. 2005;96:540-2. https://doi.org/10.1016/S0001-7310(05)73130-6
10. Peña-Romero AG, Toussaint-Caire S, Charli-Joseph Y, Dela Barreda-Becerril F, Domínguez-Cherit J. From classical to unusual: Report on 5 cases of transient reactive aquagenic pseudokeratoderma and review of the literature. Am J Dermatopathol. 2017;39:935-42. https://doi.org/10.1097/DAD.0000000000000815
11. Nazik H, Nazik S, Çoban FG, Demir B. Sporadic and familial cases of aquagenic keratoderma. J Dermatol Case Rep. 2016;10:10-3. https://doi.org/10.3315/jdcr.2016.1223
12. Kabashima K, Shimauchi T, Kobayashi M, Fukamachi S, Kawakami C, Ogata M, *et al.* Aberrant aquaporin 5 expression in the sweat gland in aquagenic wrinkling of the palms. J Am Acad Dermatol. 2008;59:S28-32. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.04.023
13. Garçon-Michel N, Roguedas-Contios A-M, Rault G, Le Bihan J, Ramel S, Revert K, *et al*. Frequency of aquagenic palmoplantar keratoderma in cystic fibrosis: A new sign of cystic fibrosis? Br J Dermatol. 2010;163:162-6. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.09764.x
14. Katz KA, Yan AC, Turner ML. Aquagenic wrinkling of the palms in patients with cystic fibrosis homozygous for the ΔF508 CFTR mutation. Arch Dermatol. 2005;141:621-4. https://doi.org/10.1001/archderm.141.5.621
15. Gündüz Ö, Özsaraç K, Ercin ME. Aquagenic palmar wrinkling induced by combined use of salazopyrin and indomethacin. Case Rep Dermatol. 2013;5:21-6. https://doi.org/10.1159/000346744
16. Pastor MA, González L, Kilmurray L, Bautista P, López A, Puig AM. Queratodermia acuagénica. Actas Dermosifiliogr. 2008;99:399-406. https://doi.org/10.1016/S0001-7310(08)74700-8
17. Baldwin BT, Prakash A, Fenske NA, Messina JL. Aquagenic syringeal acrokeratoderma: Report of a case with histologic findings. J Am Acad Dermatol. 2006;54:899-902. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.09.007
18. Errichetti E, Piccirillo A. Aquagenic keratoderma treated with tap water iontophoresis. Indian J Dermatol. 2015;60:212. https://doi.org/10.4103/0019-5154.152568

Biomédica 2019;39:252-64
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.3905

Original article

# Surveillance of phlebotomine fauna and *Didelphis marsupialis* (Didelphimorphia: Didelphidae) infection in an area highly endemic for visceral leishmaniasis in Colombia

Marlon Mauricio Ardila[1,2], Lina Carrillo-Bonilla[3,4], Adriana Pabón[5], Sara M. Robledo[3]

[1] Grupo Biodiversidad del Caribe Colombiano, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia
[2] Ciencia, Educación y Tecnología, CETIC, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia
[3] Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[4] Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[5] Grupo Malaria, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

**Introduction:** The study of the interaction between the parasite, the vector and the mammalian hosts, including man, allows to understand the behavior of the leishmaniases.
**Objective:** To determine the presence of *Lutzomyia* species and to detect the *Leishmania* infection in *Didelphis marsupialis* in an endemic area for visceral leishmaniasis.
**Materials and methods:** Phlebotomine fauna and individuals of *D. marsupialis* were collected with CDC and Tomahawk™ traps, respectively. The species of *Lutzomyia* were identified using the Young and Duncan key (1994). Ear and tail biopsies and blood samples from *D. marsupialis* were taken to identify the *Leishmania* species by amplifying a fragment of the gene associated with the 70 kD heat shock protein.
**Results:** Seven *Lutzomyia* species were identified: *Lu. evansi*, *Lu. gomezi*, *Lu. panamensis*, *Lu. dubitans*, *Lu. cayennensis cayennensis*, *Lu. rangeliana* and *Lu. trinidadensis.* The first three species have epidemiological importance in Colombia because of their implications in the transmission of the *Leishmania* parasite. Sixty-five tissue samples from 19 *D. marsupialis* individuals were negative for *Leishmania* spp.
**Conclusions:** The presence of the *Lutzomyia* species that have been identified as vectors for Leishmania inside and around houses in the village of El Bledo, in El Carmen de Bolívar represents a risk of infection. Furthermore, the presence of *Lu. panamensis* is reported for first time in El Carmen de Bolívar in Colombia. Although the lack of detection of *Leishmania* spp. in *D. marsupialis* samples may suggest that *D. marsupialis* does not play an important role in the transmission cycle of *Leishmania* in this region, it is necessary to carry out further longitudinal studies to confirm this hypothesis.

**Keywords:** Psychodidae; *Lutzomyia*; *Didelphis*; *Leishmania* spp.; leishmaniasis, visceral; polimerase chain reaction.

**Vigilancia de la fauna flebotomínea e infección de *Didelphis marsupialis* (Didelphimorphia: Didelphidae) en un área de alta endemia de leishmaniasis visceral en Colombia**

**Introducción.** El estudio de la interacción entre el parásito, el vector y los huéspedes mamíferos, incluido el hombre, permite entender el comportamiento de la leishmaniasis.
**Objetivo.** Determinar la presencia de especies del género *Lutzomyia* y detectar la infección por *Leishmania* spp. en *Didelphis marsupialis* en un área endémica de leishmaniasis visceral.
**Materiales y métodos.** Se recolectaron flebotomíneos y *D. marsupialis* con trampas CDC y Tomahawk™, respectivamente. Las especies de *Lutzomyia* se identificaron usando la clave de Young y Duncan, 1994. Se tomaron biopsias de oreja, cola y muestras de sangre de *D. marsupialis* para diagnosticar *Leishmania* spp. mediante la amplificación de un fragmento del gen de la proteína de choque térmico de 70 kD.
**Resultados.** Se identificaron siete especies de *Lutzomyia*: *Lu. evansi*, *Lu. gomezi*, *Lu. panamensis*, *Lu. dubitans*, *Lu. cayennensis cayennensis*, *Lu. rangeliana* y *Lu. trinidadensis.* Las tres primeras especies son reconocidas como vectores en el país por estar implicadas en la transmisión de *Leishmania* spp. En total, 65 muestras de tejidos de oreja, cola y de sangre provenientes de 19 *D. marsupialis* fueron negativas para *Leishmania* spp. en la PCR-HSP70.
**Conclusiones.** La presencia de flebotomíneos con importancia epidemiológica en la zona evaluada representa un riesgo de transmisión. Asimismo, *Lu. panamensis* es reportada por primera vez en El Bledo (Carmen de Bolívar). La ausencia de *Leishmania* spp. en *D.*

**Received:** 23/06/17
**Accepted:** 16/09/18
**Published:** 17/09/18

**Citation:**
Ardila MM, Carrillo-Bonilla L, Pabón A, Robledo SM. Surveillance of phlebotomine fauna and *Didelphis marsupialis* (Didelphimorphia: Didelphidae) infection in an area highly endemic for visceral leishmaniasis in Colombia. Biomédica. 2019;39:252-64. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.3905

**Corresponding author:**
Sara M. Robledo, PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Calle 70 N° 52-21, Medellín, Colombia
Telephone: (574) 219 6503
sara.robledo@udea.edu.co

**Author contributions:**
Marlon Mauricio Ardila: Conception, design, implementation, sample and data acquisition, analysis and interpretation of results, and writing of the manuscript
Lina Carrillo-Bonilla: Design, execution, analysis and interpretation of results, and writing of the manuscript
Adriana Pabón: Conception, design, analysis and interpretation of results, and writing of the manuscript
Sara María Robledo: Analysis of results and manuscript writing

**Funding:**
This work was supported by the Universidad de Atlántico through the Vicepresidency of Research, Extension, Social Projection and University Welfare and by Colciencias (CT-695-2014).

**Conflicts of interest:**
The authors have no conflicts of interest to declare.

*marsupialis* podría sugerir que esta especie no tiene un papel importante en el ciclo de transmisión de *Leishmania* en la vereda El Bledo, por lo que es necesario profundizar en estudios longitudinales para corroborar esta hipótesis.

**Palabras clave:** Psychodidae; *Lutzomyia*; *Didelphis*; *Leishmania* spp.; leishmaniasis visceral; reacción en cadena de la polimerasa.

Leishmaniasis is an infectious disease caused by metaxenic trypanosomatid parasites belonging to the *Leishmania* genus Ross, 1903 (Euglenozoa, Kinetoplastea: Trypanosomatidae). These parasites require two hosts in nature: A mammalian host which acts as a reservoir of the infectious agent and an insect host which acts as a biological vector responsible for the transmission (1-3). The domestic dog is the proven reservoir of *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*), the etiologic agent of visceral leishmaniasis (2,4), while *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758, (commonly named opossum) has been implicated as the most likely wild reservoir of this *Leishmania* species (5-9). In turn, the biological vectors are insects belonging to the phlebotomine group (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae), *Lutzomyia* species (França, 1924) in the New World (America) and *Phlebotomus* species (Rondani & Berté, 1840) in the Old World (Africa, Asia and Europe) vector (1,3).

Leishmaniasis is present in tropical and subtropical areas of the world and still endemic in 98 countries on five continents (10) but only notifiable in 33 countries (11). It is estimated to affect about 12 million people worldwide (12) and approximately 1.3 million new cases are registered each year, of which 300,000 correspond to visceral leishmaniasis and one million cases correspond to cutaneous leishmaniasis (11).

In each region, leishmaniasis has different clinical manifestations as well as ecological characteristics (parasites, vectors, reservoirs, and transmission scenarios), making more complex the study of this parasitic disease (1,13). In Colombia, 7,900 cases of leishmaniasis were recorded in 2015 of which 7,777 (98.4%) were cutaneous leishmaniasis, 108 (1.4%) mucosal leishmaniasis and 15 (0.2 %) visceral leishmaniasis (14). Ten of the 15 cases of visceral leishmaniasis diagnosed in the country occurred in the department of Bolívar, and eight of these were reported in the municipality of El Carmen de Bolívar. Thus, this region has the highest incidence of visceral leishmaniasis in the country. Despite the efforts of health agencies, the number of cases continues to increase largely due to the lack of knowledge of key factors in disease transmission, such as the presence of wild reservoirs.

Given that El Carmen de Bolívar is an endemic area for visceral leishmaniasis, the objectives of this study were to determine the presence of *Lutzomyia* species and to detect *Leishmania* spp. infection in *D. marsupialis* in and around houses in El Carmen de Bolívar, Colombia. Importantly, this will contribute to the knowledge about the presence, composition, and distribution of phlebotomine fauna and wildlife reservoirs involved in the transmission cycle in this region.

## Materials and methods

### *Study area*

The study was conducted in the village of El Bledo (N 09°45´38.0´´- W 075°10´19.1´´), El Carmen de Bolívar municipality (Bolívar, Colombia), 251 m.a.s.l. El Bledo has 48 houses and 204 inhabitants: 46 children are under 5-years old, 152 persons are 5 to 61-years old and six people are more than 62 years-old (*Secretaría de Salud del Departamento de Bolívar*, unpublished

data). Three houses built of adobe walls and palm roofs were selected for sampling. A case of visceral leishmaniasis in a child under five years was reported in one of these houses.

### *Sampling of phlebotomine specimens*

Four samplings were conducted from October to December, 2014, with three incandescent-light CDC (Centers for Disease Control and Prevention) traps in each evaluated ecotope, during three consecutive nights from 6:00 p.m. to 6:00 a.m., in the domestic (defined as the whole area within the dwelling), peridomestic (the surroundings of the house) and sylvatic ecotopes (the entire forest area), with a sampling effort of 1,296 total hours. The collected insects were killed with cold water and placed in labeled Eppendorf vials with 70% alcohol and stored for subsequent separation and taxonomic identification.

### *Sampling of wild mammals*

Ten Tomahawk™ galvanized steel traps were placed (66.04 cm x 22.86 cm x 22.86 cm) (Model 205, medium) for three consecutive nights in peridomestic and sylvatic ecotopes, with a sampling effort of 1,440 total hours. Sardine, papaya, banana or boiled egg were used as bait.

The captured wild mammals were anesthetized with a 1:9 mixture of ketamine-xylazine, administered intramuscularly. Tissue biopsies were collected from the tail and from one ear of each individual. Additionally, a blood sample from the tail of each individual was collected.

Biopsy areas were disinfected with 70% alcohol and sterile scissors (one per sample and per animal) were used. When the procedure was finished, Curagan™ (Novartis, Bogotá, Colombia) was applied to avoid infections or myiasis. The cut in the ear was triangular and always in the same ear with the intention of recognizing the recaptured animals.

In turn, the blood samples were taken in MiniCollect™ tubes of 1 mL with EDTA. One drop was deposited on a filter paper (1 cm diameter). The animals were released after recovering from the effects of anesthesia. All samples were stored immediately in a vial with ethanol and labeled for subsequent DNA extraction and PCR amplification.

### *Identification of phlebotomines*

The insects were examined under a stereoscope (Leica EZ4 Microsystem™, Mannheim, Germany) and phlebotomines were separated from other insects, rinsed with 10% KOH, dried by evaporation and mounted permanently using a mixture of xylene and Canada balm. Taxonomic identification was achieved following the Young and Duncan key (15) using a conventional microscope (Zeiss™, Buenos Aires, Argentina).

### *DNA extraction*

The extraction of DNA from ear, tail and blood samples was performed with the DNeasy Blood & Tissue Kit™ (Qiagen Genomic Inc., California, USA), following the manufacturer's instructions. For blood samples impregnated on filter paper, Chelex protocol 100X and heating was employed (16). The concentration of total DNA was quantified using a NanoDrop 1000™ (Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

### *Polymerase chain reaction (PCR) for the amplification of a Heat Shock Protein 70 kD (hsp70) gene fragment*

Primers that amplify a gene fragment coding for the 70 kDa heat shock protein (*Hsp*70-P4) (240 pb): Forward 5'GGA CGA GAT CGA GCG CAT GGT3' and reverse 5'TCC TTC GAC GCC TCC TGG TTG3' were used (17). We run 1% agarose gels to check the integrity of the DNA. When tissues are used it is necessary to determine the integrity of one constitutive DNA, for example, the β-actin protein, for the sturdiness of PCR. As a positive control, a pool of *L. donovani* and *L. infantum* DNA was used.

PCR was performed in a C1000TM BioRad thermocycler™ (BioRad, California, USA) under the following conditions: An initial heating at 95 °C for 3 min followed by 32 cycles (denaturation at 94 °C for 30 s, alignment at 63 ºC for 1 min and extension at 72 °C for 1 min) and a final incubation at 71 °C for 9 min for extension of PCR products.

Each PCR mixture was performed in a final volume of 20 µL with 2 µL of target DNA and 18 µL of reaction mixture containing 2 µL of PCR buffer 10X (10X *Taq* buffer with KCl) (Fermentas™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), 1 µL of deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP), 1.2 µL $MgCl_2$, 0.4 µL of each primer, 0.2 U/µL *Taq DNA polymerase* (Fermentas™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), 0.1 µL dimethyl sulfoxide (DMSO), and 12.7 µL miliQ sterile water. A positive control (18 µL reaction mixture + 2 µL of control DNA template) was included. Dilutions of 1:5, 1:25 and 1:125 were made from the samples that exhibited PCR inhibition and 2 µL from the positive DNA control were added to each reaction.

### *Electrophoresis and visualization of the amplification products*

The amplification products obtained by PCR were subjected to horizontal electrophoresis (40 min/110 V) in 2% agarose gels in TBE 1X buffer and ethidium bromide (0.5 µg/µL). For this, 8 µL PCR of product were mixed with 2 µL of loading buffer. The PCR products were visualized with an ultraviolet transilluminator (Bio-Rad, California, USA). Samples were considered positive when a 240 bp band was visualized using as reference the PCR positive control and a 1000 pb DNA Ladder marker™ (Fermentas™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) (18).

### *Statistical analysis*

The number of phlebotomine individuals according to the species, environment and sampling period was evaluated. The Shapiro-Wilk W test was applied in order to determine if the data conformed to a normal distribution. This was done using the PAST program, version 2.11 (19). To detect statistical differences in the comparison of wealth and abundance among different sampling points (environment-sampling period), the one-way ANOSIM test was performed. Lastly, the frequency of the species of wild mammals captured was determined.

### *Ethical considerations*

The study was approved by the Ethics Committee of the *Universidad del Atlántico*, Barranquilla, Colombia (June 11, 2014).

## Results

A total of 3,090 individuals were collected using CDC incandescent light traps: 2,052 (66.3%) females and 1,038 (33.6%) males (not normally distributed, Shapiro-Wilk test). All specimens corresponded to *Lutzomyia* spp. (table 1). *Lutzomyia evansi* (*verrucarum* group Theodor 1965) was the most representative species followed by *Lu. gomezi*, *Lu. dubitans* (*migonei* group Theodor, 1965), *Lu. panamensis* (*Psychodopygus* genus Mangabeira, 1941), *Lu. cayennensis cayennensis* (*Mycropygomyia* genus, Barreto, 1962), and two species corresponded to *Lu. rangeliana* (ungrouped species) and *Lu. trinidadensis* (*oswaldoi* group, Theodor, 1965). One-hundred and one phlebotomines corresponding to 85 female and 16 male individuals remained without identification and therefore they were recorded as *Lutzomyia* spp.

**Table 1.** Diversity and abundance of phlebotomines collected in the village of El Bledo, El Carmen de Bolívar (Bolívar)

| Species | D | | | PD | | | S | | | ♀ | ♂ | Total (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ♀ | ♂ | Total | ♀ | ♂ | Total | ♀ | ♂ | Total | | | |
| *Lu. evansi** | 439 | 107 | 546 | 594 | 198 | 792 | 379 | 196 | 575 | 1,412 | 501 | 1,913 (61.91) |
| *Lu. gomezi** | 149 | 100 | 249 | 106 | 215 | 321 | 51 | 128 | 179 | 306 | 443 | 749 (24.24) |
| *Lu. panamensis** | 16 | 7 | 23 | 53 | 20 | 73 | 42 | 6 | 48 | 111 | 33 | 144 (4.66) |
| *Lu. dubitans* | 88 | 13 | 101 | 23 | 14 | 37 | 18 | 17 | 35 | 129 | 44 | 173 (5.60) |
| *Lu. c. cayennensis* | 2 | 1 | 3 | 3 | 0 | 3 | 2 | 0 | 2 | 7 | 1 | 8 (0.26) |
| *Lu. rangeliana* | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.03) |
| *Lu. trinidadensis* | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.03) |
| *Lutzomyia sp.* | 46 | 3 | 49 | 23 | 9 | 32 | 16 | 4 | 20 | 85 | 16 | 101 (3.27) |
| **Total** | | 971 | | | 1,260 | | | 859 | | 2,052 | 1,038 | 3,090 |

D: Domestic; PD: Peridomestic; S: Sylvatic; ♀: Female; ♂: Male

* Species with epidemiological background

*Lutzomyia evansi* was also the most abundant species in the three ecotopes sampled during the study. The peridomestic ecotope provided the greatest wealth and abundance with 1,260 individuals grouped into seven species. However, no statistically significant differences were observed in terms of abundance and wealth between sampling periods and ecotopes evaluated (p=0.4872, ANOSIM test).

Overall, 19 individuals of *D. marsupialis* (11 males and 8 females) were captured that corresponded to 12 adults and 7 juvenile specimens. The largest catches (n=15) were made in the peridomestic ecotopes. Sixty-four samples were taken in total: Ears (n=19), tails (n=16), and blood (n=13) collected in MiniCollect™ tubes with 1 mL of EDTA and 16 blood samples collected on filter paper. All samples were negative for *Leishmania* spp. PCR inhibition was confirmed in one sample (figure 1). The inhibition was neutralized at a dilution of 1:125.

## Discussion

El Bledo village provides the ecological conditions for maintaining the transmission cycle of leishmaniasis because most of the houses are constructed with adobe walls with roofs of palm branches that allow the vector to settle. In this work, a total of 3,090 *Lutzomyia* spp. individuals, distributed into seven species, were collected.

*Lutzomyia evansi* was the most representative species identified in the present study. This is a species commonly found in several countries in

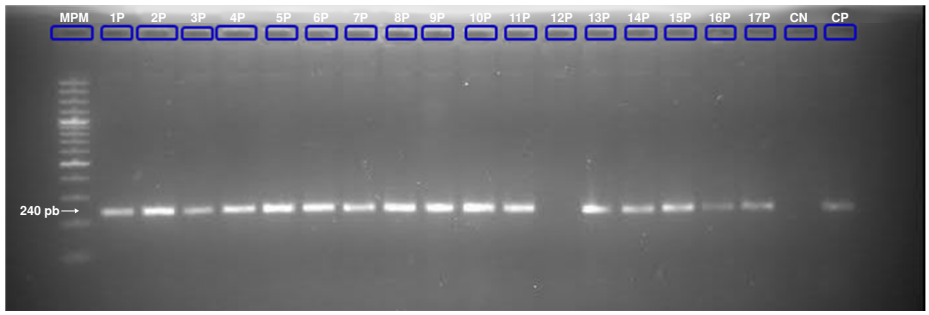



**Figure 1.** *Hsp70* gene amplification of DNA samples extracted from ear tissues of *Didelphis marsupialis* mixed with a DNA positive control

MPM: Molecular weight marker (100-1000 pb); wells 1P-17P: Ear samples with DNA positive control; CN: Negative control; CP: Positive control; 240bp: Band corresponding to control amplicon

Central and South America (15), from the tropical dry forest (0-500 m.a.s.l) to the dry montane forest (500-1500 m.a.s.l) (20). In addition, *Lu. evansi* is the main vector of *Leishmania* species causing visceral leishmaniasis throughout the Colombian Caribbean region (21) and in some regions of Venezuela (22). It is also associated with the transmission of *L. braziliensis,* one of the etiologic agents of cutaneous leishmaniasis in South America (23). Furthermore, *Lu. evansi* was recognized for the first time as the main vector of *L. chagasi (*syn*. L. infantum)* in San Andrés de Sotavento (Colombia, 9°08'43"N - 75°30'31"O) (21).

*Lutzomyia gomezi* was the second most significant species in this study, consistent with other work done in Sincelejo (Sucre) by Lambraño, *et al.* (24). It has been found infected with *L. panamensis* in Colombia by Santamaría, *et al.* (25) and it is the proven vector of *L. panamensis* in Panamá (26), although it has also been found infected with *L. braziliensis* in Venezuela (27,28) and recognized as a vector of *Leishmania* species that cause cutaneous leishmaniasis in Colombia and in other regions in South America (3). It has been reported in Venezuela, Bolivia, Ecuador, Perú, French Guiana, southern Brazil, Nicaragua, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Trinidad and Tobago, and Colombia (15,29).

*Lutzomyia gomezi* has been registered in the municipality of El Carmen de Bolívar (department of Bolívar, Colombia) (30). Interestingly, its wide distribution lies in its ability to be an eclectic species, allowing greater ability to colonize in completely degraded environments. This facilitates access to various food resources, among these, a variety of mammals including humans (31).

*Lutzomyia panamensis* (n=144) corresponded to the fourth most abundant species of all phlebotomines collected in the present study. However, it is the third in epidemiological importance, being the most abundant reported by Pérez, *et al.* (32). *Lutzomyia panamensis* has a wide distribution in Central and South America countries, including Colombia (5). Furthermore, it is considered anthropophilic and a vector of the etiologic agents of cutaneous leishmaniasis in different regions of Colombia, Panamá, and Venezuela (25,26,33).

*Lutzomyia c. cayennensis* is a phlebotomine that has a wide distribution in Central and northern South America (15). It has been reported in the department of Bolívar (Colombia), mainly in El Carmen de Bolívar (30) and is often found in foci of visceral leishmaniasis, where *Lu. evansi* and *Lu. longipalpis* predominate (34). Although the abundance recorded in this study was low (n=8, 0.26%), these individuals were collected in the three

environments evaluated. The females of this species are characterized by feeding on the blood of reptiles and perching on the walls of the houses, which preferably give them greater contact with lizards, a behavior that is observed only in the Caribbean region (35,36). However, at high densities, they could also attack humans (3). *Lutzomyia c. cayennensis* has been found naturally infected with trypanosomatids in Ovejas (Sucre, Colombia) (35) and in Venezuela (28,37).

The medical significance of the *Lu. dubitans* species found in this study is unknown because it has not been identified as a vector (38).

*Lutzomyia rangeliana* and *Lu. trinidadensis* were the phlebotomine species with the lowest recorded abundance, each of them with a single individual (0.03%). The first species is restricted to Venezuela, Trinidad and Tobago, Panamá, and Colombia. *Lutzomyia trinidadensis* has a wide geographical distribution in Central America and northern South America (15) and it is associated with the distribution of different species of lizards (36). To date, the role these species play in *Leishmania* spp. transmission remains in discussion. However, in Venezuela, these species were found positive for flagellates (37,39). It has also been related to visceral leishmaniasis foci where *Lu. evansi* usually predominates (24,32,34,35,40).

There were no significant differences found when the diversity and abundance among the different environments were evaluated (domestic, peridomestic and sylvatic ecotopes) and then compared with the sampling period. This could be due to the fact that the distance between each trap was approximately 20 meters, which is perhaps very short. Therefore, we recommend using a greater distance between the traps to see if the pattern seen in the present study is maintained. Nevertheless, the captured species cannot be suspected as vectors in the study area, because vectorial capacity tests such as natural infection were not performed among the captured species. On the other hand, one cause of the results could be the fact that in urban or suburban areas there is not one a well-defined separation between domestic, peridomestic and sylvatic ecotopes.

In Colombia, although limited, here are some studies related to the identification of *Leishmania* spp. in domestic and wild mammals. Dogs are animals of companionship and surveillance in the different human activities in the forest (mainly hunting and logging), and therefore they have a high degree of exposure to vectors. The dog has been identified as an important reservoir because canines are in permanent contact with humans and have been involved in the maintenance of the transmission cycle for *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) (2). However, among vertebrate host species related to cutaneous leishmaniasis, the domestic dog has been the centre of controversy and there is a lack of consensus regarding their role as reservoir (2,41). In Colombia, few studies have been carried out on the role of dogs in the cycle of *L. panamensis* and *L. braziliensis*, two of the major species of *Leishmania* spp. in the country. Santaella, *et al.* (42) and Vélez, *et al.* (43) described a natural infection with *L. guyanensis, L. panamensis* and *L. braziliensis* in symptomatic dogs. The finding of dogs infected with *Leishmania* spp. shows their susceptibility but it is not enough to implicate dogs as reservoirs and, therefore, more and stronger evidence is needed.

Similarly, the role played by wild mammals in the different cycles of *Leishmania* spp. transmission is still unknown. From the epidemiological point of view, the first wild mammals described with natural infection in Colombia

were *D. marsupialis* in El Callejón (Cundinamarca) (5,6), *D. marsupialis* and *Proechimys canicollis* in San Andrés de Sotavento (Córdoba) (7,8), and *D. marsupialis* and *P. canicollis* in Colosó (Sucre) (8). The presence of corrals and wild or cultivated vegetation around houses favor the attraction of synanthropic mammals that could be potential reservoirs to *Leishmania* species.

In the present study, only *D. marsupialis* (n=19) were captured around houses, although none of them were positive for *Leishmania*. They have a wide geographical distribution from northwestern México to Bolivia, coinciding with cutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis foci, making this species a highly suspicious reservoir. In Colombia, this species is found from 0 to 2,500 ma.s.l. It adapts easily to different environments such as wet and dry forests. They can even inhabit urban and suburban areas (44), although they may or may not have direct contact with humans. *Didelphis marsupialis* is identified as a bioindicator species for highly intervened environments, which makes them easily adaptable that can survive in human-modified environments and occupy abandoned spaces (9,45). Thus, they are considered highly specialized species when the environment is changed. Because *D. marsupialis* is a species with nocturnal and nomadic behaviors, it is in constant exposure to vectors and, therefore, may serve as a bridge between vectors and humans in the sylvatic and peridomestic transmission cycles. It can even function as a probable bridge between endemic and non-endemic areas for leishmaniasis (9,44). This finding, in association with the presence of recognized vectors such as *Lu. evansi, Lu. gomezi* and *Lu. panamensis* around houses, may increase the risk factor for the residents of a given community (2,21,23,25,33,38,46).

The absence of positive animals suggests that there are other factors that affect the dynamics of this parasite infection, particularly in a highly endemic area for visceral leishmaniasis such as El Carmen de Bolívar. Furthermore, *D. marsupialis* is the suspected reservoir of both cutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis foci in Colombia, Brazil, Venezuela, and in French Guiana, including *Leishmania* species not pathogenic to humans (5-9,47).

The captured animals did not show skin lesions suggestive of cutaneous leishmaniasis and their skin and blood samples were negative for the parasite. This negative result might be explained by i) the relatively short timing of capture of mammals that led to a low number of individuals evaluated, ii) not including other tissues in the sampling such as liver, spleen, bone marrow, and/or lymph node that could favor the detection of visceralized species such as *L. infantum*, and iii) the fact that *Didelphis marsupialis* has not been previously identified as a reservoir of *Leishmania* spp. in the studied area, which suggests that other wild mammals may be participating in the natural cycle of transmission of *Leishmania* spp. in this area. Supportive of our findings, De Lima, *et al.* (48) did not find *D. marsupialis* naturally infected with *Leishmania* spp. However, new samples with a more complex experimental design are needed to test the hypothesis that other wild animals participate in the cycle of transmission.

The present study cannot rule out this species as a reservoir for not revealing detectable infection in a determined moment by PCR. This is because the dynamics between wild hosts and parasites are complex, leading to a plethora of manifestations such as behavioral changes in the host (49). The monitoring for this group of mammals must be continuous, especially in highly endemic areas.

At the present, PCR is a highly sensitive technique and is used in epidemiological studies of leishmaniasis for the detection and identification of *Leishmania* species DNA in samples from patients, vectors, and reservoirs (25,50,51). Using PCR to detect the presence of the *hsp*70 gene as a molecular marker increases sensitivity to nearly 100% compared with blood cultures and xenodiagnosis (transmissibility), while the use of the gold standard allows to determine whether a mammal may be considered as a reservoir over other methods such as microscopy, Montenegro skin test (52), and serological tests (53).

This occurs because PCR directly tests the presence of the parasitic DNA in the host sample, regardless of the immune status of the mammalian host (54). Moreover, amplifying the *hsp70* gene with a series of gene-specific primers increases the sensitivity of parasite detection because this gene has the highest resolution over other molecular markers such as internal spacers of the ribosomal RNA transcription (ITS- rRNA), the 7SL (spliced leader) RNA, and DNA from the kinetoplast (51). It also allows the detection of genetic variability in molecules associated with immunological processes and has a high probability of being detected due to its very high number of copies (12,52,55-57).

This study represents an approximation to the phlebotomine fauna in El Bledo village, where three epidemiologically important species were reported: *Lu. evansi, Lu. gomezi and Lu. panamensis.* Additionally, although these species were identified in the three ecotopes evaluated, they were mainly found around the houses, which correlates with the places where the largest number of individuals of *D. marsupialis* were also collected.

The phlebotomine species collected in this work were not evaluated for the presence of *Leishmania* parasites. Thus, further studies of natural infection in the phlebotomine species with known epidemiological backgrounds are needed in order to understand the full manifestation of the disease at any given time and to include all the members of the eco-pathogen complex (vector-parasite-host).

This study reports the presence of *Lu. evansi* inside the houses and its surroundings, indicating that the village of El Bledo could be an area for transmission of visceral leishmaniasis, which exacerbates the public health problem in that region. Interestingly we found several synanthropic *Lutzomyia* species in one small area. In addition, this study reports for the first time the presence of *Lu. panamensis* in El Carmen de Bolívar, thus expanding its geographical distribution throughout the department of Bolívar (Colombia).

This is the first study conducted in the municipality of El Carmen de Bolívar (Bolívar) assessing the natural infection of *Leishmania* spp. in synanthropic mammals and opening the way to new investigations for the discovery of potential reservoirs of *Leishmania* spp. Although the presence of the parasite was not detected in the specimens sampled, it is important to continue with this type of study to ensure that *D. marsupialis* is not part of the transmission cycle of *Leishmania* (at least in El Bledo village) and to identify other wild mammals that could act as potential reservoirs of *Leishmania* spp.

Implementation of continuous monitoring and conducting all appropriate protective measures, mainly at the level of vector control in the intradomicile environments, by public health institutions is very important. If in the evaluated area the parasite is circulating amongst domestic or other mammals, the domestic or peridomestic vector transmission may establish a new focus of leishmaniasis transmission in Colombia.

## Acknowledgments

The authors would like to thank the *Unidad de Entomología* of the *Secretaría de Salud*, District of Barranquilla; the *Unidad de Entomología* of the *Laboratorio de Salud Pública del Departamento de Bolívar*, and the *Secretaría de Salud de Bolívar* for providing field logistics. The authors would also like to thank the *Laboratorio de Entomología* of the *Secretaría de Salud*, *Departmento de Sucre*, for their help in the identification of the phlebotomines. The authors would also like to thank B. Karman for his review of the English language. Finally, the authors would like to thank the community of El Bledo for the support provided during the samplings.

## References

1. Vélez ID, Hendrickx E, Robledo SM, Agudelo S. Leishmaniosis cutánea en Colombia y género. Cad Saúde Pública. 2001;17:171-80. https://doi.org/10.1590/S0102-311X2001000100018
2. Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Vet Parasitol. 2007;149:139-46. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.007
3. Cortés LA, Fernández JJ. Especies de *Lutzomyia* en un foco urbano de leishmaniasis visceral y cutánea en El Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia. Biomédica. 2008;28:440-3. https://doi.org/10.7705/biomedica.v28i3.81
4. Romero M, Sánchez JA. Una mirada a la epidemiología y al control de la leishmaniasis zoonótica en Colombia. Biosalud. 2007;5:99-111.
5. Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Morales A, Ferro C, Young DG, *et al*. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1989a;40:480-6. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.40.480
6. Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Peláez D, Diaz A, Montilla M, *et al*. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989b;83:195.
7. Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Goncalves A, *et al*. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1994;50:557-65. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.50.557
8. Travi BL, Osorio Y, Becerra MT, Adler GH. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1998;92:275-8.
9. Roque A, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. Int J Parasitol. 2014;3:251-62. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004
10. Ramírez C, Requena J, Puerta C. Alpha tubulin genes from *Leishmania braziliensis*: genomic organization, genes structure and insights on their expression. BMC Genomics. 2013;14:454-66. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-454
11. World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected. Geneva: WHO; 2013.
12. Hernández C, Álvarez C, González C, Ayala M, León C, Ramírez J. Identification of six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. Parasit Vectors. 2014;7:501-8. https://doi.org/10.1186/s13071-014-0501-y
13. Fernández M. Eco-epidemiología de vectores de *Leishmania* spp. en el noreste de la Argentina (Provincia de Misiones) (tesis). Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2012.
14. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal, BES. Semana epidemiológica No. 52 de 2015 (27 de diciembre-02 enero). Fecha de consulta: 25 de marzo de 2016. Available in: http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2015%20Boletin%20epidemiologico%20Semana%2052.pdf
15. Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Amer Ent Inst. 1994;54:1-881.

16. Barrera S, Pérez M, Knudson A, Nicholls R, Guerra A. Genotipificación de *Plasmodium falciparum* por PCR múltiple por medio de los genes *msp1*, *msp2* y *glurp*, en cuatro localidades de Colombia. Biomédica. 2010;30:530-8. https://doi.org/10.7705/biomedica.v30i4.291

17. Graça GC, Volpini AC, Romero GA, Oliveira MP, Hueb M, Porrozzi R, *et al.* Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107:664-74. https://doi.org/0.1590/S0074-02762012000500014

18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

19. Hammer Ø, Harper DA, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontología Electrónica. 2001;4:1-9.

20. Feliciangeli MD, Arredondo C, Ward R. Phlebotomine sand flies in Venezuela: Review of the *verrucarum* species group (in part) of *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) with description of a new species from Lara. J Med Entomol. 1992;29:729-44.

21. Travi BL, Vélez ID, Brutus L, Segura I, Jaramillo C, Montoya J. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990;84:676-77.

22. Feliciangeli MD, Rodríguez N, De Guglielmo Z, Rodríguez. A. The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II. Vectors and parasites. Parasite. 1999;6:113-20. https://doi.org/10.1051/parasite/1999062113

23. Bejarano EE, Pérez A, Paternina L, Paternina M, Martínez L. Natural infection of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania* (*Viannia*) spp. in northern Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2012;87:173.

24. Lambraño LF, Manjarrez G, Bejarano EE. Variación temporal de especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) en el área urbana de Sincelejo (Colombia). Salud Uninorte. 2012;28:191-200.

25. Santamaría E, Ponce N, Zipa Y, Ferro C. Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* en dos focos endémicos en el occidente de Boyacá, piedemonte del valle del Magdalena medio, Colombia. Biomédica. 2006;26:82-94. https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1503

26. Christensen HA, Fairchild G, Herrer A, Johnson C, Young D, De Vásquez A. The ecology of cutaneous, leishmaniasis in the Republic of Panamá. J Med Entomol. 1983;20:463-84.

27. Feliciangeli MD, Rodríguez N, Bravo A, Arias F, Guzmán B. Vectors of cutaneous leishmaniasis in North-central Venezuela. Med Vet Entomol. 1994;8:317-24. https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1994.tb00095.x

28. Rodríguez N, Aguilar CM, Barrios MA, Barker DC. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999;93:47-9.

29. Bejarano EE, Estrada LG. Family Psychodidae. Zootaxa. 2016;4122:187-238. https://doi.org/10.11646/zootaxa.4122.1.20

30. Cortés L. Foco de leishmaniasis en el Hobo, Municipio de El Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia. Biomédica. 2006;26:236-41. https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1518

31. Contreras-Gutiérrez MA, Vélez ID, Porter C, Uribe SI. An updated checklist of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from the Colombian Andean coffee-growing region. Biomédica. 2014;34:483-98. https://doi.org/10.1590/S0120-41572014000300017

32. Pérez A, Hernández E, Bejarano EE. *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) de la Reserva Serranía de Coraza y Montes de María, Colombia. Rev Colomb Entomol. 2008;34:98-101.

33. Duttari LC, Loaiza JR. American cutaneous leishmaniasis in Panamá: A historical review of entomological studies on anthropophilic *Lutzomyia* sand fly species. Parasit Vectors. 2014;7:218-28. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-218

34. Travi BL, Adler GH, Lozano M, Cadena H, Montoya J. Impact of habitat degradation on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forests in Northern Colombia. J Med Entomol. 2002;39:451-6.

35. Cochero S, Anaya Y, Díaz Y, Paternina M, Luna A, Paternina L, *et al.* Infección natural de *Lutzomyia cayennensis cayennensis* con parásitos tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Los Montes de María, Colombia. Rev Cubana Med Trop. 2007;59:35-9.

36. Johnson RN, Young DG, Butler JF, Bogaert-Diaz H. Possible determination of the vector and reservoir of leishmaniasis in the Dominican Republic. Am J Trop Med Hyg. 1992;46:282-7. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.46.282

37. Bonfante R, Urdaneta R, Urdaneta I, Alvarado J, Perdomo R. Natural infection of *Lutzomyia rangeliana* (Ortiz, 1952) (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania* in Barquisimeto, Lara State, Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94:11.

38. Cortés L, Pérez A, Bejarano EE. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) antropofílicos de importancia en salud pública en Los Montes de María, Colombia. Rev Cubana Med Trop. 2009;61:220-5.

39. Bonfante R, Urdaneta R, Urdaneta I, Alvarado J. Natural infection of *Lutzomyia trinidadensis* (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990;85:477. https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000100005

40. Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez ID. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:645-7. https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000500010

41. Reithinger R, Davies C. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. Am J Trop Med Hyg. 1999;61:530-41.

42. Santaella J, Ocampo C, Saravia N, Méndez F, Góngora R, Gómez M, *et al. Leishmania* (*Viannia*) Infection in the domestic dog in Chaparral, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2011;84:674-80. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0159

43. Vélez ID, Carrillo LM, López L, Rodríguez E, Robledo SM. An epidemic outbreak of canine cutaneous leishmaniasis in Colombia caused by *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*. Am J Trop Med Hyg. 2012;86:807-11. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0408

44. Aponte J. Una revisión de la biología del *Didelphis marsupialis* y su relación con el mal de Chagas y la leishmaniasis. Bogotá, D.C.: Uniandes; 2013. p. 94-101.

45. Cuartas CA, Marín D. Descripción de especies. En: Cuartas CA, Marín D, editores. Guía ilustrada. Mamíferos del cañón del río Porce - Antioquia. Medellín: EPM E.S.P. Universidad de Antioquia, Herbario Universidad de Antioquia, Colombia; 2014. p. 19-29.

46. Barreto M, Burbano ME, Barreto P. Nuevos registros de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) y triatominos (Hemiptera: Reduviidae) para Risaralda, Cauca y Valle del Cauca, Colombia. Colombia Med. 1997;28:116-22.

47. Yoshida E, Silva R, Cortez L, Corréa F. Encontro de espécie do género *Leishmania* en *Didelphis marsupialis aurita* no Estado de Sao Paulo, Brasil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1979;21:110-3.

48. De Lima H, Carrero J, Rodríguez A, De Guglielmo Z, Rodríguez N. Trypanosomatidae de importancia en salud pública en animales silvestres y sinantrópicos en un área rural del municipio Tovar del estado Mérida, Venezuela. Biomédica. 2006;26:42-50. https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1393

49. Herrera L. Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Bol Malariol Sal Amb. 2010;50:3-15.

50. Bogild AK, Valencia BM, Espinosa D, Veland N, Ramos AP, Arevalo J, *et al.* Detection and species identification of *Leishmania* DNA from filters paper lesion impressions for patients with American cutaneous leishmaniasis. Clin Infect Dis. 2010;50:1-6. https://doi.org/10.1086/648730

51. Montalvo AM, Fraga J, Montano I, Monzote L, van der Auwera G, Marín M, *et al.* Identificación molecular con base en el gen *hsp*70 de aislamientos clínicos de *Leishmania* spp. en Colombia. Biomédica. 2016;36:37-44. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2688

52. García L, Kindt A, Bermúdez H, Llanos A, De Doncker S, Arevalo J, *et al.* Culture independent species typing of Neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR- based assay targeting Heat Shock Protein 70 genes. J Clin Microbiol. 2004;42:2294-7. https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2294–2297.2004

53. Bodini M, Vasconcelos R, Fattori K, Prado D, De Fátima A, Felix V. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (Sao Paulo, Brazil). Vet Parasitol. 2007;150:283-90. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.026

54. Reale S, Maxia L, Vitale F, Gloriosos NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs por PCR with lymph node aspirates and blood. J Clin Microbiol. 1999;37:2931-5.

55. García AL, Téllez T, Parrado R, Rojas E, Bermúdez H, Dujardin JC. Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis: Molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007;101:1208-13. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.09.002

56. Montalvo AM, Fraga J, Montano I, Monzote L, Marín M, van der Auwera G, *et al.* Differentiation of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* using BccI for *hsp*70 PCR-RFLP. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010;104:364-7. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.12.002

57. van der Auwera G, Ravel C, Verweij JJ, Bart A, Schönian G, Felger I. Evaluation of four single-Locus markers for *Leishmania* species discrimination by sequencing. J Clin Microbiol. 2014;52:1098-104. https://doi.org/10.1128/JCM.02936-13

Biomédica 2019;39:265-77
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.3973

Original article

# Detection of *Trypanosoma cruzi* strains circulating in Córdoba department (Colombia) isolated from triatomines (Hemiptera: Reduviidae) collected by the community

Cielo León[1], Mario Iván Ortiz[1], Catalina Tovar[2], Jorge Negrete[2], Ernesto Arroyo[2], Camila González[1]

[1] Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical, CIMPAT, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Grupo de Enfermedades Tropicales y Resistencia Bacteriana, Universidad del Sinú, Montería, Colombia

**Introduction:** From 2011 to 2016, 24 cases of Chagas disease were reported in Córdoba according to the national public health surveillance system (*Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública*, Sivigila), but the information regarding *Trypanosoma cruzi* circulating strains and infection rates are unknown.
**Objectives:** To establish the triatomine species with which people come in contact and recognize as Chagas disease vectors, as well as to assess the infection with trypanosomes and make an exploratory approach to host feeding preferences with the participation of the local community.
**Materials and methods:** Triatomines sampling was conducted in 12 municipalities between 2011 and 2016; *T. cruzi* infection was established by k-PCR, SAT-PCR, while strain genotyping was done by mini-exon and SL-IR (spliced-leader intergenic region) sequence characterization. We also screened for blood sources.
**Results:** Local community members collected the majority of triatomines and we identified three species: *Rhodnius pallescens, Panstrongylus geniculatus,* and *Eratyrus cuspidatus*. The overall *T. cruzi* infection rate in collected triatomines was 66.6% and we detected the $TcI_{DOM}$ and TcI sylvatic strains. Community-based insect collection allowed reporting the presence of *P. geniculatus* in two new disperse rural settlements, *T. cruzi* infection of *P. geniculatus* in Córdoba, and the first report of triatomines infected with *T. cruzi* in Montería municipality.
**Conclusions:** These results revealed the presence of triatomines infected with *T. cruzi* inside dwellings in five municipalities of Córdoba. The dominant circulating *T. cruzi* strain was $TcI_{DOM}$, a genotype associated with human Chagas disease and cardiomyopathies in Colombia. Our results highlight the importance of local community participation in entomological surveillance tasks.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; *Rhodnius; Panstrongylus*; Reduviidae; Triatominae.

**Detección y caracterización molecular de cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de triatominos recolectados por la comunidad en el departamento de Córdoba, Colombia**

**Introducción.** Entre el 2011 y el 2016, se reportaron 24 casos de enfermedad de Chagas en Córdoba, según el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila), pero la información sobre las unidades discretas de tipificación de *Trypanosoma cruzi* circulantes y las tasas de infección se desconoce.
**Objetivos.** Identificar las especies de triatominos con las cuales las personas entran en contacto y que reconocen como vectores de la enfermedad de Chagas, así como establecer la infección por tripanosomas y explorar posibles fuentes de alimentación de los triatominos con la participación de la comunidad.
**Materiales y métodos.** El muestreo de triatominos se hizo en 12 municipios entre el 2011 y el 2016. *T. cruzi* se detectó mediante las técnicas de *kinetic-polymerase chain reaction* (k-PCR) y *serial amplification of targets-polymerase chain reaction* (SAT-PCR), en tanto que la genotipificación de las cepas se logró mediante la caracterización de secuencias de genes miniexon y de la región intergénica SL-IR (*Spliced-Leader Intergenic Region*). Se evaluaron, asimismo, las fuentes de alimento.
**Resultados.** La mayoría de los triatominos fue recolectada por miembros de la comunidad y se identificaron tres especies: *Rhodnius pallescens*, *Panstrongylus geniculatus* y *Eratyrus cuspidatus.* La tasa de infección general por *T. cruzi* fue de 66,6 % y se detectaron las cepas $TcI_{DOM}$ y TcI sylvatic. La participación de la comunidad permitió reportar la presencia de *P. geniculatus* en dos nuevas localidades, la infección con *T. cruzi* de *P. geniculatus* en

**Received:** 11/07/17
**Accepted:** 17/09/18
**Published:** 18/09/18

**Citation:**
León C, Ortiz MI, Tovar C, Negrete J, Arroyo E, González C. Detection of *Trypanosoma cruzi* strains circulating in Córdoba department (Colombia) isolated from triatomines (Hemiptera: Reduviidae) collected by the community. Biomédica. 2019;39:265-77. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.3973

**Corresponding author:**
Cielo León, Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical, Universidad de los Andes, Carrera 1 Nº 18A - 12, bloque A, segundo piso, Bogotá, D.C., Colombia
Telephone: (571) 339 4949, extension 3395
cm.leon@uniandes.edu.co

**Author contributions:**
Cielo León: Molecular analysis and manuscript preparation
Mario Iván Ortiz: Triatomines identification, data analysis, and manuscript preparation
Jorge Negrete and Ernesto Arroyo: Specimen collection and community work
Catalina Tovar: Specimens collection and study design
Camila González: Study design, data analysis, and manuscript preparation

**Funding:**
*Sistema General de Regalías, Colombia*, contract number 754-2013 and *Gobernación de Córdoba*

**Conflicts of interest:**
There are no conflicts of interest.

Córdoba y reportar por primera vez triatominos infectados con *T. cruzi* en Montería.
**Conclusiones.** Se demostró la presencia de triatominos infectados con *T. cruzi* dentro de las viviendas en cinco municipalidades. La cepa circulante dominante fue *T. cruzi* $TcI_{DOM}$, asociada con la enfermedad de Chagas y con cardiomiopatías en Colombia. Los resultados resaltan la importancia de vincular a miembros de la comunidad en la vigilancia entomológica.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*; enfermedad de Chagas; *Rhodnius*, *Panstrongylus*; Reduviidae; Triatominae.

Chagas disease (CD) is caused by the parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* (1), and mainly transmitted by blood-sucking vectors of the Reduviidae family. This disease is considered unattended and a serious public health problem in Latin America (2) due to the number of persons at risk and the lack of adequate and accessible treatment (3).

*Trypanosoma cruzi* exhibits a broad intraspecific genetic diversity and is classified into six discrete typing units (DTUs) identified from TcI to TcVI (4,5). TcI presents the broadest geographical distribution, which covers from the southern United States of America to northern Argentina and Chile. This DTU can be found in the sylvatic and domestic transmission cycles (5-7) and is known to infect 150 species belonging to 24 families of domestic and wild animals (8).

The main vectors of *T. cruzi* in the Andean region, the southern cone, and some areas of Central America are: *Rhodnius prolixus, Triatoma dimidiata, Triatoma infestans,* and *Panstrogylus megistus* (9). A total of 26 species has been reported in Colombia and 15 of them have been found naturally infected with *T. cruzi*. *R. prolixus,* and *T. dimidiata* are considered primary vectors, whereas *Panstrogylus geniculatus*, *Triatoma maculata*, *Rhodnius pictipes,* and *Rhodnius pallescens* are considered secondary vectors (8).

In Colombia, the prevalence of Chagas disease has been estimated between 700,000 and 1,200,000 infected people and 3,500,000 people at risk (10). The Andean region is the most densely populated of the country and it harbors the municipalities with the highest Chagas disease transmission risk followed by the Orinoquia region (8,11). The departments with the highest infection rates are Arauca (21.1%), Casanare (10%), Santander (6.3%), Norte de Santander (5.2%), Boyacá (3.7%), Cundinamarca (1.9%), and Meta (1.7%) (11).

However, it is important to mention that as a neglected tropical disease, and due to the delay in the time of appearance of clinical symptoms (that can be diagnosed after 40 years of infection), the prevalence and incidence of Chagas disease are highly underestimated due to case underreport (12).

In the Caribbean coast, at least one case of the disease has been reported in every department (13-15). The known vectors found infected with *T. cruzi* are *R. prolixus*, *T. maculata*, *T. dimidiata*, *R. pallescens,* and *Eratyrus cuspidatus*, which are distributed in seven departments there (8).

The department of Córdoba is located north of Colombia on the Caribbean plains between 09°26'16'' and 07°22'05'' N, and 74°47'43'' and 76°30'01'' W, with an altitude between 260 and 2,200 m.a.s.l. It has 1,709,644 inhabitants distributed over an approximate total area of 23,980 $km^2$, with a climate that goes from semi-wet to arid, and it includes 30 municipalities (16).

There are three main types of ecosystems in Córdoba: savannas, forests, and aquatic (marine and freshwater) systems. These ecosystems form a tropical wet biome with a high variety of native flora and fauna (17). Such diversity makes it suitable for the presence of Chagas disease vectors and

reservoirs and for the establishment of different cycles of Chagas disease transmission. Furthermore, Córdoba socioeconomic characteristics favor the establishment of the disease, especially poverty (46.6%) and extreme poverty (12.9%), and a Gini coefficient of 0.465 (18).

The main vector species in Córdoba is *R. pallescens*, which has been reported naturally infected with *T. cruzi* and *T. rangeli* in this region (8). *Panstrongylus geniculatus* and *E. cuspidatus* have also been reported. There is no information on *P. geniculatus* infection for this region so far, while *E. cuspidatus* has been reported naturally infected with *T. cruzi* (8). Between 2012 and 2016, 20 cases of Chagas disease were reported in Córdoba by the *Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública* (Sivigila) with an average of 4.2 cases per year (15) (figure 1).

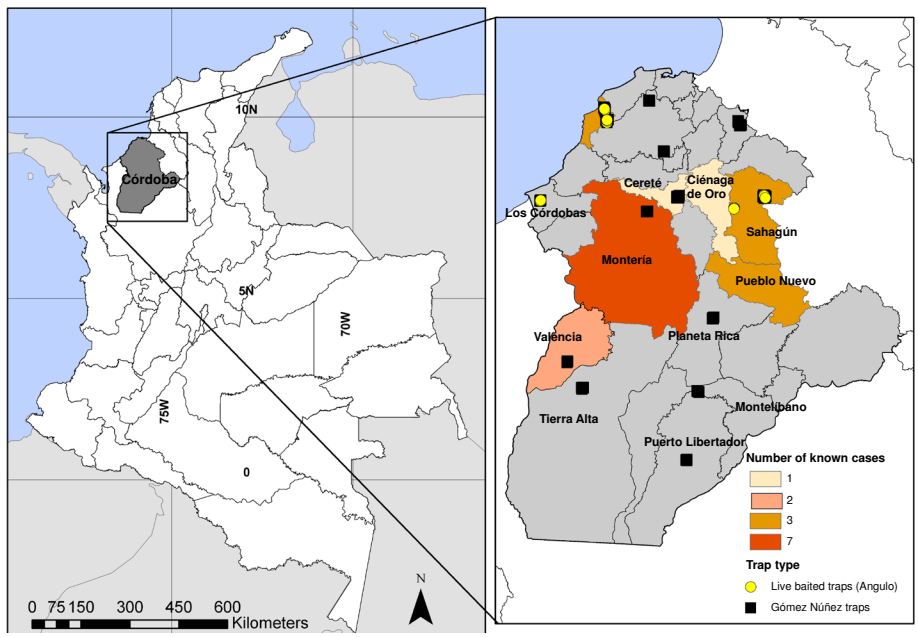



**Figure 1.** Location of Córdoba department in Colombia and distribution of municipalities and dispersed rural settlements (*veredas*) where sampling was performed. Chagas disease cases distribution by municipality (2012-2016) is also shown. In each of the 24 houses visited per dispersed rural settlement, two Gómez-Núñez traps were placed. Additionally, Angulo traps were placed in five dispersed rural settlements.

Regarding the entomological surveillance of the disease, community participation has proven to be the most appropriated strategy to develop a sustainable, effective, and efficient Chagas disease prevention program (19). An essential aspect to achieve this participation is that community members that interact with triatomines recognize them as Chagas disease vectors (19). Dumonteil, *et al*. (20) demonstrated that community-based collection was the most sensitive and cost-effective method as compared with timed manual searches for monitoring domestic and peridomestic infestation by non-domiciliated triatomines (20).

Due to the low number of cases occurring in Córdoba, little is known regarding vectors involved in Chagas disease transmission and circulating parasite strains. In 2011, the program "*Diseño de un programa de estudios en infecciones y salud tropical para el departamento de Córdoba*" received funds from the *Sistema General de Regalías* (general system of royalties) to determine the baseline for the study of tropical neglected diseases in the department.

In the context of this project, the aim of this study was to establish the triatomine species with which people come in contact and recognize as Chagas disease vectors, their infection with trypanosomes, and the insects host feeding preferences with the participation of local community members. Our results put in evidence that Chagas disease is present in Córdoba and contributed new records of triatomine insects, their spatial distribution, their infection with different *T. cruzi* strains, and information on their food sources in order to provide health authorities with relevant information for decision-making regarding tropical neglected diseases in the department of Córdoba.

## Materials and methods

### *Insect collection*

As a part of the above-mentioned program, fieldwork was performed in 12 municipalities and 15 dispersed rural settlements in Córdoba, Colombia, where 24 houses were randomly selected to conduct sampling of hematophagous insects. For triatominae screening, two Gómez-Núñez traps (21) were placed inside each of the 24 houses selected in each settlement from 2011 to August, 2016. The traps were checked for the presence of triatomines once a month.

Since triatominae collection in urban settings is challenging, we first visit each municipality to educate people on the importance of Chagas disease and to ask if they had seen triatomine bugs inside their houses. In three municipalities (Los Córdobas, Sahagún, and Moñitos), where human cases had been reported during the time of the study, we provided collection jars to the dwellers after explaining the general aspects of the disease and the risk of vector transmission and people were asked to deliver all collected specimens to the local health authorities.

A total of 96 houses were initially included for community sampling and, finally, triatomines were obtained from 45 houses. In each municipality, one inhabitant was designated to gather the insects obtained from different houses, to record the information, and to deliver the insects to the health authorities once a month.

Collected insects were then delivered to *Universidad del Sinú* to perform parasite detection in the rectal ampulla by dissection and then to the *Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical*, CIMPAT at *Universidad de Los Andes*, where species identification and molecular analyses were performed.

Additional sampling with Angulo traps was performed in the three municipalities where collection jars were provided (22). In Moñitos, two Angulo traps were placed in palm trees on the night of May 12, 2015 (09°14'45.9'' N, 76º04' 54.6'' W, 79 m.a.s.l.). In Sahagún dispersed rural settlements of Salitral (June 28 to July 1, 2016) and Villa Lucía (August 8 to 11, 2016), and in Los Córdobas and Guaimaro Abajo (August 1 to 3, 2016), three traps were placed during three consecutive nights in different species of palm trees around houses where infection had been presumably acquired (figure 1).

Collected specimens were identified by external morphological characters using Lent and Wygodzinsky taxonomic key (23) and Weirauch, *et al.*, illustrated key (24).

### *Parasite detection*

To perform parasite detection and blood meal analyses using molecular methods, DNA was extracted from triatomine intestinal content using the High Pure PCR Template Preparation Kit™ (Roche, USA) following manufacturer instructions.

Parasite detection by k-PCR was performed through amplification of a kinetoplastid DNA sequence with PCR using the 121 (5'AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA 3') and 122 (5' GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA 3') primers (25) in a final volume of 25 µL containing 1X Go Taq Green Master Mix M7123™ (Promega, USA), 0.5 µM of each primer, and 3 µL of DNA.

The thermal profile consisted of an initial denaturation at 94°C for 3 min followed by 5 cycles at 94ºC for 1 min, annealing for 1 min at 68°C and 1 min at 72°C, then 35 cycles at 94°C for 45 s, annealing for 45 s at 64°C and 45 s at 72°C followed by a final extension step at 72°C for 10 min. The PCR products were resolved by 2% agarose gel electrophoresis and stained with SYBR Safe™ (Invitrogen, Ref. S33102) generating a product with a length of 330 bp for *T. cruzi* and of 400-450 bp for *T. rangeli*.

According to the diagnostic algorithm for *T. cruzi* (26), the k-PCR results were confirmed with an SAT-PCR assay as follows: A satellite DNA sequence was amplified with PCR using the Cruzi 1 (5' ASTCGGCTGATCGTTTTCGA 3') and Cruzi 2 (5' AATTCCTCCAAGCAGCGGATA 3') primers (27) in a final volume of 25 µL containing 1X Go Taq Green Master Mix M7123™ (Promega, USA) and 0.5 µM of each primer and 3 µL of DNA.

The thermal profile consisted of an initial denaturation at 94°C for 5 min followed by 40 cycles at 94°C for 1 min, annealing for 30 s at 64°C and for 1 min at 72°C. The PCR products were resolved by 2% agarose gel electrophoresis and stained with SYBR Safe™ (Invitrogen, Ref. S33102) generating a product with a length of 166 bp for *T. cruzi*.

### *Genotyping*

To perform *T. cruzi* molecular genotyping, the mini-exon gene was amplified with PCR using the TCC (5' CCCCCCTCCCAGGCCACACTG 3'), TC1M (5' GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC 3') and TC2 (5' CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG 3') primers (28) in a final volume of 25 µL containing 1X Go Taq Green Master Mix M7123™ (Promega, USA), 0.5 µM of each primer, and 3 µL of DNA.

The thermal profile consisted of an initial denaturation at 94°C for 5 min followed by 5 cycles at 94°C for 1 min, annealing for 1 min at 67°C and 1 min at 72°C, then 5 cycles at 94°C for 1 min, annealing for 1 min at 65°C and 1 min at 72°C; 5 cycles at 94°C for 1 min, annealing for 1 min at 63°C and for 1 min at 72°C, and 30 cycles at 94°C for 1 min, annealing for 1 min at 61°C and for 1 min at 72°C followed by a final extension step at 72°C for 10 min. The PCR products were resolved by 2% agarose gel electrophoresis and stained with SYBR Safe™ (Invitrogen, Ref. S33102), generating a product with a length of 350 bp for TcI and 300 bp for TcII.

An SL-IR (spliced-leader intergenic region) sequence was amplified with PCR using the 1 Am (5' TGTGTGTGTATGTATGTG 3') (29) and the 1 B (5' CGGAGCGGTGTGTGCAG 3') primers (30) in a final volume of 20 µL containing 1X Buffer Taq™ (Invitrogen, USA), 0.25 mM of each dNTP, 1.5

mM $MgCl_2$, 2,5 µM of each primer, 1 unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA), and 3 µL of DNA.

The thermal profile consisted of an initial denaturation step at 94°C for 4 min followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, 20 s at 55°C, and 30 s at 72°C with a final extension at 72°C for 10 min. The PCR products were resolved by 2% agarose gel electrophoresis and stained with SYBR™ Safe (Invitrogen, Ref. S33102) generating a product with a length of 231 bp for $TcI_{DOM}$ and 450-550 bp for TcI sylvatic.

### *Blood source detection*

A PCR-based blood source detection was performed using the primers for the cytochrome b gene previously described (31). For detection of avian-derived blood source, the PCR was first conducted with the primers Avian-3 (5' GACTGTGAYAAAATYCCMTTCCA 3') and Avian-4 (5´GYCTTCAITYTTTGGYTTACAAGAC 3') followed by a nested PCR with Avian-3 and Avian-8 (5' TCTTTGGTTTACAAGACCAATGTTT 3'). For mammalian derived blood source, the PCR was first conducted with primers Mammalian-1 (5' TGAYATGAAAAAYCATCGTTG 3') and Mammalian-2 (5' TGTAGTTRTCWGGGTCKCCTA 3') and followed by nested PCR with Mammalian-2 and Mammalian-7 (5' AAAAACCATCGTTGTATTTCAACTA 3').

The PCRs were performed in a final volume of 25 µL containing 1X Go Taq Green Master Mix M7123™ (Promega, USA), 0.5 µM of each primer, and 3 µL of DNA.

The thermal profile consisted of an initial denaturation at 94°C for 2 min followed by 35 cycles at 94°C for 30 sec, annealing for 30 sec at 55°C and for 1 min at 72°C, and a final extension step at 72°C for 4 min. The PCR products were resolved by 2% agarose gel electrophoresis and stained with SYBR Safe™ (Invitrogen™ Ref. S33102) generating a product with a length of 530 bp for avian blood sources and 810 bp for mammalian blood sources.

All PCR positives products were bidirectionally sequenced at the DNA sequencing laboratory of *Universidad de Los Andes* using the ABI-3500 Genetic Analyzer™ (Life Technologies).

## Results

### *Insect collection*

In total, 46 insects were collected, 45 (97.8%) by community members from five municipalities and one (2.1%) was captured using Angulo traps. No insects inside the houses were collected with Gómez-Núñez traps. All the collected specimens belonged to order Hemiptera, 37 to subfamily Triatominae, tribes Rhodniini and Triatomini, five to Reduviidae no Triatominae (predators), and four non Reduviidae (phytophagous) (table 1).

From 37 collected Triatominae, 34 were identified as belonging to three species: *R. pallescens*, *P. geniculatus,* and *E. cuspidatus.* In the remaining three, species identification wasn't performed due to the damage of specimens during transport. *Rhodnius pallescens* was the species with the largest number of captured individuals (23) followed by *P. geniculatus* with 10 and *E. cuspidatus* with 1. From these 34 identified specimens, 31 were adults and 3 were nymphal instars. Out of the 37 collected triatomines, 36 (97.3%) were collected in dwellings at night and only one (2.7%), a nymphal instar, was collected in the peridomicile.

**Table 1.** Species of triatomines collected in Córdoba

| Triatomine species | Number of triatomine/municipaly (%) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Moñitos n % | Sahagún n % | Los Córdobas n % | Cotorra n % | Montería n % |
| *Rhodnius pallescens* | 14 (33.3) | 8 (19) | 1 (2.4) | 0 (0) | 0 (0) |
| *Panstrongylus geniculatus* | 7 (16.6) | 1 (2.4) | 1 (2.4) | 1 (2.4) | 0 (0) |
| *Eratyrus cuspidatus* | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (2.4) |
| *Damaged specimens* | 1 (2.4) | 2 (4.8) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| *Reduviidae no Triatominae* | 1 (2.4) | 4 (9.5) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Total | 23 | 15 | 2 | 1 | 1 |

The triatomines were sent from five municipalities: Sahagún, Moñitos, Los Córdobas, Cotorra, and Montería (these two last municipalities were not previously included for community sampling, but two specimens were sent to the health authorities during the present study). The highest number of insects was captured in Moñitos (22 individuals) followed by Sahagún (11), Los Córdobas (2) Cotorra (1), and Montería (1) (figure 2).

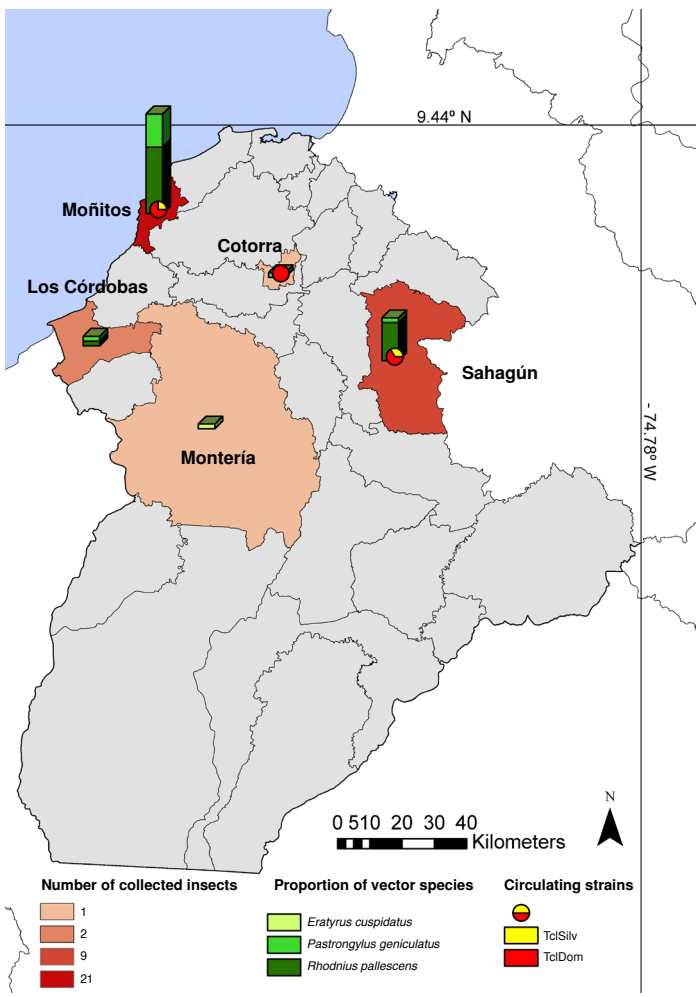



**Figure 2.** Municipalities where triatomine bugs were collected showing total number of collected insects, proportion of triatomine species, and *Trypanosoma cruzi* circulating strains

### *Parasite detection*

Eighteen triatomines were processed to establish possible infection by trypanosomes using PCR: Four were negative, 13 were positive for *T. cruzi,* and one for *T. rangeli.* From the 13 *T. cruzi* positive individuals, seven were *R. pallescens,* three *P. geniculatus,* and one *E. cuspidatus*. The remaining two specimens could not be identified due to the damage of taxonomic characters during transport. The insect infected with *T. rangeli* was identified as *R. pallescens*.

### *Genotyping*

Genotyping showed that all the *T. cruzi* positive insects belonged to the TcI genotype. Nine were infected with the genotype *T. cruzi* $TcI_{DOM}$: six *R. pallescens* (five from Moñitos and one from Sahagún), two *P. geniculatus* (one from Moñitos and one from Cotorra), and one specimen that could not be identified from Moñitos. The remaining infected insects had TcI sylvatic genotype: One *R. pallescens,* another specimen that could not be identified from Moñitos, and one *P. geniculatus* from Sahagún (figure 2, table 2).

**Table 2.** Genotyping of *Tripanosoma* cruzi detected in triatomines

| Municipality | Triatomine species | *Trypanosoma cruzi* TcI | | | *Trypanosoma rangeli* | Negative |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $TcI_{DOM}$ | TcI sylvatic | Unidentified* | | |
| Moñitos | *Rhodnius pallescens* | 5 | 1 | | | |
| | *Panstrongylus geniculatus* | 1 | | | | |
| | Unidentified damaged specimens | 1 | 1 | | | |
| Sahagún | *Rhodnius pallescens* | 1 | | | 1 | 3 |
| | *Panstrongylus geniculatus* | | 1 | | | |
| | Unidentified damaged specimens | | | | | 1 |
| Cotorra | *Panstrongylus geniculatus* | 1 | | | | |
| Montería | *Eratyrus cuspidatus* | | | 1 | | |

* Unidentified genotype as no genotypification was done.

### *Blood source detection*

From 37 triatomine insects, 13 had blood and all these were processed. For these 13 insects, it was possible to establish the blood source in six of them using only conventional PCR; of the five *R. pallescens* specimens, three were positive for mammalian blood and two for both mammalian and avian blood, while one *P. geniculatus* insect was positive for mammalian blood. No sequence was obtained for any of the samples.

## Discussion

Most of the collected triatomines (80.5%) corresponded to species known as Chagas vectors. The three species detected, *R. pallescens*, *P. geniculatus,* and *E. cuspidatus,* have been previously reported in the department of Córdoba (8). *Rhodnius pallescens* was the most abundant species (62.2%) followed by *P. geniculatus* (27%) and *E. cuspidatus* (2.7%). These findings are consistent with the few reports known for this region that show *R. pallescens* as the predominant species (8). Most of the *R. pallescens* specimens were collected in two previously reported municipalities, Moñitos and Sahagún, and only one individual was captured in Los Córdobas municipality.

In total, ten specimens of *P. geniculatus* were collected. Most of the specimens (seven) were collected in Moñitos. One specimen was collected in each of the following dispersed rural settlements: Sahagún, Cotorra, and Los Córdobas. This species had been previously reported in Moñitos and Sahagún (8), but it is the first time it has been reported in Cotorra and Los Córdobas. New records for two municipalities of the department were a *P. geniculatus* specimen collected in Cotorra municipality and one collected in Los Córdobas.

The species *E. cuspidatus* has been previously reported in Córdoba, but only in the municipality of Buenavista (8); in the present study, one specimen was collected in Montería. This is the first time that the presence of triatomines in Montería has been reported.

Three municipalities where triatomines were found (Sahagún, Cotorra, and Montería) have a savannah ecosystem. Two municipalities (Moñitos and Los Córdobas) have a coastal ecosystem (32). It is interesting to note that Sahagún is characterized by a dry environment and the presence of plant associations formed by palm trees, especially *Attalea butyracea* (32). The presence of palm trees may facilitate the establishment of triatomines in dwellings in this municipality. In a different palm tree species, *Cocos nucifera*, one nymphal instar of *R. pallescens* was collected using Angulo traps in Moñitos municipality.

In the present study, the majority of the triatomines (89.1%) were collected in two municipalities, Moñitos and Sahagún. Most of the insects in these two municipalities were captured indoors. However, no sign of domiciliation was evident, as was shown by the absence of insects in the Gómez-Núñez traps. Three Chagas cases have been reported in each of these two dispersed rural settlements between 2012 and 2016 (15), which represent 30% of the reported Chagas cases for the department.

Seven Chagas cases have been reported in Montería in the last five years. This is the municipality with the highest number of cases (33%) (15). However, the presence of triatomines had not been reported previously. In the present study, one *E. cuspidatus* infected with *T. cruzi* was collected and it is the first report of triatomines presence in this municipality.

The overall infection rate of *T. cruzi* among processed triatomines was 72% (13/18). The infection rate for *R. pallescens* was 64% (7/11), for *P. geniculatus* it was 100% (3/3), and for *E. cuspidatus,* 100% (1/1) (the remaining two *T. cruzi* positive specimens were not identified due to damage of the specimens). These indexes demonstrate that people in these areas are at high risk of *T. cruzi* infection, especially having in mind that most of the triatomines, 97.3% (36/37), were found by community members in their dwellings. Two new reports of natural infection for the department of Córdoba were recorded in this study: one *P. geniculatus* infected with *T. cruzi* and one *R. pallescens* infected with *T. rangeli.*

All collected insects positive for infection with trypanosomes presented *T. cruzi* DTU TcI, except for one that was positive for infection with *T. rangeli*. Currently, *T. cruzi* is recognized as a complex of six lineages or DTUs named TcI to TcVI (4,33). Each DTU can be loosely associated with a particular ecological and/or geographical framework. TcI has been found from Argentina to the United States, while TcII to VI are distributed from the Amazon basin to the south of Argentina (33,34). Nevertheless, it is possible to find regions where all DTUs are present, as it is the case of Colombia, where TcI has been predominantly reported while TcII, TcIII, TcIV, and TcVI have been reported in a low proportion (34).

TcI DTU is ubiquitous among arboreal sylvatic foci throughout the geographic distribution of *T. cruzi.* It is the major DTU associated with Chagas disease in humans and cardiomyopathies in northern South America (33,35). Several molecular tools now identify substantial genetic diversity within TcI; these new approaches consistently reveal the presence of a genetically divergent and homogeneous TcI group, currently called $TcI_{DOM}$, and a second TcI group called sylvatic genotype (33,35).

In the present study, from 11 triatomines positive for *T. cruzi* TcI infection, nine were infected with the genotype $TcI_{DOM}$. This conclusion is supported by recent findings where the circulation of $TcI_{DOM}$ is emerging in Colombia. In this study, sylvatic TcI was observed in 48% and $TcI_{DOM}$ in 52% of the isolates, concluding that this genotype is still adapting to the domestic cycle of transmission (36).

The remaining two *T. cruzi* TcI infected insects presented the TcI sylvatic genotype. This genotype is associated with the sylvatic cycle and with the peridomestic cycle of Chagas disease in Colombia. It has been isolated from synanthropic reservoirs like *Didelphis marsupialis* and *Rattus rattus* (35). In this study, feeding preferences were determined in six triatomines. All of them had fed on mammalian blood and two of them had also fed on avian blood. It was not possible to establish the mammalian or avian species due to the lack of correspondence between the sequences in the GenBank. In some cases, it was not possible to obtain a consensus sequence probably due to the euryphagic behavior exhibited by the triatomines (37).

For *R. pallescens*, different mammalian blood sources, including opossum, anteater, sloth, rodent, and human, have been reported. Christensen, *et al.* (38) demonstrated that slightly more than half of the *R. pallescens* collected in houses and nearby palm trees and bird nests feed on humans in Panamá (38). Opossums, which are important reservoirs of *T. cruzi* in Panamá and Colombia, were the second most frequently selected host (38).

The community participation in entomological surveillance could be a good strategy to determine the presence of triatomines, establish infection indexes, and detect circulating DTUs and genotypes in the area. The community-based collection method allowed to report the presence of triatomines and infected triatomines for the first time in some dispersed rural settlements. The time (15-20 days) between the collection and the delivery to the entomology technicians was a problem of this strategy. During this period of time, triatomines died and the specimen dried affecting further molecular procedures.

Our results revealed the presence of *T. cruzi* infected triatomines inside the dwellings and the predominance of $TcI_{DOM}$, a *T. cruzi* DTU associated with Chagas disease in humans and cardiomyopathies in Colombia (35). We also concluded that *R. pallescens*, the most abundant vector species in the area, apparently feeds on mammalian blood. According to the literature, this species has an anthropophagic affinity, especially in rural areas (38). All these results together demonstrate that Chagas disease is a threat for the inhabitants of these five municipalities, especially in Moñitos and Sahagún dispersed rural settlements. It is necessary to implement entomological surveillance programs that incorporate the community-based collection component.

Finally, our results highlight the participation of local community members in entomological surveillance tasks and confirm that community-based collection is an excellent tool for monitoring non-domiciliated triatomines (20). All captured insects were Hemiptera, which shows that people from these five municipalities are aware of this important group of insects.

## References


1. Chagas C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;1:159-18. https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008
2. Teixeira A, Nitz N, Guimaro M, Gomes C, Santos-Buch C. Chagas disease. Postgrad Med J. 2006;82:788-98. https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.047357
3. Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102 (Supl. 1):95-7. https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000106
4. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:1051-4. https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021
5. Zingales B, Miles M, Campbell D, Tibayrenc M, Macedo A, Teixeira M, *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 2012;12:240-53. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009
6. Añez N, Crisante G, da Silva F, Rojas A, Carrasco H, Umezawa E, *et al.* Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas disease. Trop Med Int Health. 2004;9:1319-26. https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01333.x
7. Guhl F, Ramírez JD. *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision? Acta Trop. 2011;119:1-4. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.04.002
8. Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. Biomédica. 2007;27(Supl. 1):143-62. https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.258
9. Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes De Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). Infect Dis Clin North Am. 2012;26:275-91. https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002
10. Instituto Nacional de Salud. Enfermedad de Chagas. Fecha de consulta: 30 de enero de 2017. Disponible en: http://simposiovirologia.ins.gov.co/temas-de-interes/Paginas/chagas.aspx
11. Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(supl. 1):17-30. https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900005
12. Zambrano P. Protocolo de vigilancia en salud pública: Chagas. Fecha de consulta: 14 de noviembre de 2016. Disponible en: http://simposiovirologia.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Chagas.pdf
13. Montilla M, Soto H, Parra E, Torres M, Carrillo P, Lugo L, *et al.* Infestación por triatominos en comunidades indígenas de Valledupar, Colombia. Rev Saúde Pública. 2011;45:773-80. https://doi.org/10.1590/S0034-89102011005000037
14. Cantillo O, Garcés E, Gómez A, Cortés L, Pereira A, Marcet P, *et al.* Eco-epidemiological study of an endemic Chagas disease region in northern Colombia reveals the importance of *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae), dogs and *Didelphis marsupialis* in *Trypanosoma cruzi* maintenance. Parasit Vectors. 2015;22:482. https://doi.org/10.1186/s13071-015-1100-2
15. Instituto Nacional de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública-Sivigila. Fecha de consulta: 14 de noviembre del 2016. Disponible en: http://www.portalsivigila.ins.gov.co/sivigila/reportes/pages/vigilancia.php
16. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Atlas estadístico. Fecha de consulta: 16 de noviembre de 2016. Disponible en: http://www. http://sige.dane.gov.co/atlasestadistico/
17. Sociedad Geográfica de Colombia. Departamento de Córdoba. Fecha de consulta: 14 de noviembre de 2016. Disponible en: http://www.sogeocol.com.co
18. Freire EE, Perfetti del Corral M. Pobreza Monetaria 2015: Córdoba. Fecha de consulta: 15 de noviembre de 2016. Disponible en: http://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/informacion-regional

19. Salomon OD. Aspectos de prevención de la enfermedad de Chagas con participación de la comunidad. Fecha de consulta: 14 de noviembre de 2016. Disponible en: http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/md1/md103/salomon.htm

20. Dumonteil E, Ramírez-Sierra MJ, Ferral J, Euan-García M, Chávez-Núñez L. Usefulness of community participation for the fine temporal monitoring of house infestation by non-domiciliated triatomines. J Parasitol. 2009;95:469-71. https://doi.org/10.1645/GE-1712.1

21. Gómez-Núñez JC. Desarrollo de un nuevo método para evaluar la infestación intradomiciliaria por *Rhodnius prolixus*. Acta Cien Ven. 1965;16:26-31.

22. Angulo V, Esteban L. Nueva trampa para la captura de triatominos en hábitats silvestres y peridomésticos. Biomédica. 2011;31:264-68. https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i2.301

23. Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Bulletin of the American Museum of Natural History. New York: American Museum of Natural History; 1979. p. 389.

24. Weirauch C, Bérenger JM, Berniker L, Forero D, Forthman M, Frankenberg S, *et al.* An illustrated identification key to assassin bug subfamilies and tribes (Hemiptera: Reduviidae). Can J Art Iden. 2014;26:1-115.

25. Wincker P, Britto C, Borges J, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. Am J Trop Med. Hyg. 1994;51:771-7. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.771

26. Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, *et al.* Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Trop Med Hyg. 2003;68:574-82.

27. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, *et al.* Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. Acta Trop. 2007;103:195-200. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.05.019

28. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1996;83:141-52. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02755-7

29. Villa LM, Guhl F, Zabala D, Ramírez JD, Urrea DA, Hernández DC, *et al.* The identification of two *Trypanosoma cruzi* I genotypes from domestic and sylvatic transmission cycles in Colombia based on a single polymerase chain reaction amplification of the spliced-leader intergenic region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108:932-5. https://doi.org/10.1590/0074-0276130201

30. Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Guhl F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. Acta Trop. 2009;110:15-21. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.12.003

31. Sawabe K, Isawa H, Hoshino K, Sasaki T, Roychoudhury S, Higa Y, *et al.* Host-feeding habits of *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) collected at the urban and suburban residential areas of Japan. J Med Entomol. 2010;47:442-50.

32. Rangel JO. Colombia Diversidad Biótica XI Patrones de la estructura y de la riqueza de la vegetación en Colombia. Bogotá: Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional; 2011. p. 485.

33. Zumaya-Estrada FA, Messenger LA, López-Ordóñez T, Lewis MD, Flores-López CA, Martínez-Ibarra AJ, *et al.* North American import? Charting the origins of an enigmatic *Trypanosoma cruzi* domestic genotype. Parasit Vectors. 2012;5:226. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-226

34. Duque MC, Ramírez JD, Rendón LM, Guhl F. Evaluación de la variabilidad genética de aislamientos colombianos de *Trypanosoma cruzi* mediante marcadores microsatélites. Infectio. 2011;15:227-34. https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70736-6

35. Ramírez JD, Duque MC, Montilla M, Cucunubá Z, Guhl F. Natural and emergent *Trypanosoma cruzi* I genotypes revealed by mitochondrial (Cytb) and nuclear (SSU rDNA) genetic markers. Exp Parasitol. 2012;132:487-94. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.09.017

36. León C, Hernández C, Montilla M, Ramírez J. Retrospective distribution of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110:387-93. https://doi.org/10.1590/0074-02760140402

37. Zeledón R, Rabinovich JE. Chagas' disease: An ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. Annu Rev Entomol. 1981;26:101-33. https://doi.org/10.1146/annurev.en.26.010181.000533

38. Christensen HA, de Vásquez AM. Host feeding profiles of *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae) in rural villages of Central Panamá. Am J Trop Med Hyg. 1981;30:278-83. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1981.30.278

Biomédica 2019;39:278-90
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4312

Original article

# Geographical distribution of *Leishmania* species in Colombia, 1985-2017

Jussep Salgado-Almario[1], Carlos Arturo Hernández[2], Clemencia Ovalle-Bracho[1]

[1] Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

**Introduction:** Knowledge of the geographical distribution of *Leishmania* species allows guiding the sampling to little-studied areas and implementing strategies to define risk zones and priority areas for control.
**Objective:** Given that there is no publication that collects this information, the search, review, and compilation of the available scientific literature that has identified species in Colombia is presented in this paper.
**Materials and methods:** A bibliographic search was performed in PubMed, Web of Knowledge, Google Scholar, SciELO and LILACS with the terms "(*Leishmania* OR *Leishmaniasis*) AND species AND Colombia", without restrictions on publication year, language or infected organism; records of national scientific events and repositories of theses from Colombian universities were also included.
**Results:** Eighty-six scientific documents published between 1985 and 2017 were found in which the species of *Leishmania* and their geographical origin were indicated. The species reported, in descending order of frequency, were: *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*, *L.* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*V.*) *guyanensis*, *L.* (*Leishmania*) *infantum*, *L.* (*L.*) *amazonensis*, *L.* (*L.*) *mexicana*, *L.* (*V.*) *colombiensis*, *L.* (*V.*) *lainsoni* and *L.* (*V.*) *equatorensis*; the last three were found with the same frequency. *Leishmania* species were reported from 29 departments.
**Conclusion:** Information on the distribution of *Leishmania* species in Colombia is limited; therefore, it is necessary to gather existing data and propose studies that consolidate the distribution maps of *Leishmania* species in Colombia. This would allow the detection of areas where species have not been identified as well as the comparison of existing parasite and vector distributions.

**Keywords:** *Leishmania*; leishmaniasis/epidemiology; geographic mapping; vectors diseases; reservoirs; Colombia.

**Distribución geográfica de las especies de *Leishmania* en Colombia, 1985-2017**

**Introducción.** El conocimiento de la distribución geográfica de las especies de *Leishmania* permite orientar el muestreo hacia áreas poco estudiadas e implementar estrategias para detectar zonas de riesgo y áreas prioritarias de control.
**Objetivo.** Dado que no existe una publicación que reúna esta información, se planteó la revisión y compilación de la literatura científica disponible de estudios de identificación de especies del país.
**Materiales y métodos.** Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica en *PubMed*, *Web of Knowledge*, Google Académico, SciELO y Lilacs con los términos "(Leishmania OR Leishmaniasis) AND especie AND Colombia", así como en memorias de eventos científicos nacionales y repositorios de tesis y trabajos de grado de universidades del país.
**Resultados.** Se encontraron 86 documentos científicos publicados entre 1985 y 2017, en los cuales se informaron la especie de Leishmania y el origen geográfico. Las especies circulantes reportadas, en su orden de frecuencia, fueron: *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*, *L.* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*V.*) *guyanensis*, *L.* (*Leishmania*) *infantum*, *L.* (*L.*) *amazonensis*, *L.* (*L.*) *mexicana, L.* (*V.*) *colombiensis*, *L.* (*V.*) *lainsoni* y *L.* (*V.*) *equatorensis*, las últimas tres, con igual frecuencia. Los reportes proceden de 29 departamentos.
**Conclusión.** La información de la distribución de las especies de *Leishmania* en Colombia es limitada. Por lo tanto, se necesita reunir los datos existentes y plantear trabajos que permitan consolidar el mapa de distribución de las especies en el país, lo cual permitiría detectar las zonas sin información de las especies circulantes y establecer la concordancia entre su distribución y la de los vectores.

**Palabras clave:** *Leishmania*; leishmaniasis/epidemiología; mapeo geográfico; vectores de enfermedades; reservorios; Colombia.

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by flagellated protozoa of the genus *Leishmania* which are transmitted by the bite of female phlebotomine sand flies and can give rise to any of the three main clinical forms in the human host: Cutaneous, mucosal or visceral.

**Received:** 09/02/18
**Accepted:** 16/09/18
**Published:** 01/10/18

**Citation:**
Salgado-Almario J, Hernández CA, Ovalle CE. Geographical distribution of *Leishmania* species in Colombia, 1985-2017. Biomédica. 2019;39:278-90. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4312

**Corresponding author:**
Clemencia Ovalle-Bracho, Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, Avenida 1 N° 13A-61, Bogotá, D.C., Colombia
Phone numbers: (571) 2428160, extension 137, and (315) 305 2392
clemovalle@gmail.com

**Author contributions:**
Jussep Salgado-Almario: article search, draft preparation, review and editing
Carlos Arturo Hernández: conceptualization, article search, draft preparation, review and editing
Clemencia Ovalle-Bracho: conceptualization, supervision, project administration, article search, draft preparation, review and editing

**Funding:**
The study was completely developed and funded by the *Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, E.S.E.*, code-project 4000-16.1

**Conflicts of interest:**
The authors express that there is no conflict of interest.

According to data from the World Health Organization (WHO), there have been cases reported in 102 countries, with an annual estimate of 0.2 to 0.4 million cases of visceral leishmaniasis, and 0.7 to 1.2 million of cutaneous leishmaniasis (1). With the exception of the islands of San Andrés and Providencia, leishmaniases are diseases endemic to Colombia, with 10,743 confirmed cases in 2016. Of these, 10,561 corresponded to the cutaneous form, 122 to the mucosal form, and 60 to the visceral form (2). As such, Colombia is among the top ten countries with the highest incidence of cutaneous leishmaniasis in the world, where 60 % of the population is at risk of acquiring this clinical form (3).

In Colombia, five studies have been conducted to establish the geographical distribution of *Leishmania* spp. (4-8). The identification of species was made from parasites isolated from patients, sand flies, and animal hosts. Geographical distribution maps were drawn that indicated the origin of the patient or the infected organism. However, these studies achieved only partial coverage of the different areas of the country and the distribution of circulating species is still largely unknown in many parts of Colombia. Other smaller-scale studies, which reported disease outbreaks through active case finding or the capture of sand flies as well as potential reservoirs, have filled in some gaps regarding the presence of *Leishmania* spp. in other geographical zones (9-13).

Currently, there is no publication that compiles the reports of species in Colombia; for this reason, this work aimed to search, review, and compile the available scientific literature regarding *Leishmania* spp. and their geographical distribution in Colombia.

## Materials and methods

### *Search strategy and selection criteria*

A bibliographic search was carried out in PubMed, Web of Knowledge, Google Academic, SciELO and LILACS databases in order to collect all available information related to the identification of *Leishmania* species in Colombia. The search was made with the combination of the boolean terms "(*Leishmania* OR *Leishmaniasis*) AND species AND Colombia", without restrictions on the year of publication, language or infected organism. In addition, the records of national scientific events (among them those of eleven Colombian Congresses of Tropical Medicine from 1987 to 2015) and repositories of theses from Colombian universities were searched.

The identification of parasites to the genus level, the geographical origin of the patient, and the vector or the infected reservoir were used as inclusion criteria.

### *Extraction and synthesis of information*

For this review, all available scientific literature that met the inclusion criteria was taken into account; however, given the large number of documents, only published articles and gray literature with unique reports in the country were included.

Once the search results were compiled, the duplicate articles were identified and eliminated. Subsequently, those in which the title and summary were not related to the topic of interest were excluded. The full text of the articles, abstracts, and theses was reviewed to identify those that met the inclusion criteria.

During the review of each document, the following data were extracted: The geographical origin of the sample, the host (human, vector or reservoir), the clinical form of the disease, the typing method used, and the species or subgenus identified.

## Results

There were 86 articles published between 1985 and 2017 in which the species of the *Leishmania* spp. and the geographical origin of the sample were indicated (Annex 1). Of these, 57 were scientific articles and 29 corresponded to gray literature, of which 26 were abstracts presented at national scientific events and 3 were undergraduate degree theses.

### *Geographical distribution*

Studies of the geographical distribution of *Leishmania* spp. report, in order of their frequency, the circulation of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*, *L.* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*V.*) *guyanensis*, *L.* (*Leishmania*) *infantum*, *L.* (*L.*) *amazonensis*, *L.* (*L.*) *mexicana*, *L.* (*V.*) *colombiensis*, *L.* (*V.*) *lainsoni,* and *L.* (*V.*) *equatorensis*; the last three with equal frequency (4-8).

According to the studies by Corredor, *et al*. (4), Ovalle, *et al*. (5), and Ramírez, *et al*. (6), in which the distribution of species by department is described, *L.* (*V.*) *panamensis*, *L.* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*L.*) *mexicana* and *L.* (*L.*) *infantum* are, in order, the species with the greatest geographical distribution and are present in 22, 19, 12 and 8 departments of the country, respectively. These studies provide an approximation of the distribution of *Leishmania* spp. in Colombia; however, they do not represent the entire country.

It is worth noting that some species grow better in cultures than others. Given this fact, when comparing *L.* (*V.*) *panamensis* and *L.* (*V.*) *braziliensis* frequencies, caution must be exercised in claiming that one species' geographical distribution is greater or lesser than that of other species.

To determine the distribution of *Leishmania* spp. by department, we compiled information of the identified species and the geographical origin of the organism based on the 86 works that were found in the bibliographical review. Information on geographical origin was variable; some studies included detailed information, including the municipality, the county (*vereda*) or both, and others included less detailed information, such as department, natural region or river basins. The geographical scale depended primarily on the study coverage; studies of cases and outbreaks of leishmaniasis provided the most detailed information.

We also describe the geographical distribution of the *Leishmania* species reported in Colombia (4-42). However, given the small number of studies with detailed information on geographical origin, we decided to characterize the distribution by department (table 1 and figure 1).

*Leishmania* (*V.*) *panamensis* was identified in 39 of the 86 included studies. It was reported in 26 of the 32 Colombian departments. The departments with the highest number of reports of this species are, in order of frequency, Chocó (15/39), Antioquia (14/39), and Valle del Cauca (11/39), which are located in the western part of the country. According to the studies that included detailed information on the origin of the patients, *L.* (*V.*) *panamensis* was identified in 52 municipalities of 12 departments of Colombia. Of these municipalities, 28 belong to the department of Antioquia. There are no reports of this species in the departments of Amazonas, Atlántico, Cesar, La Guajira, and Quindío.

**Table 1.** *Leishmania* species reported in Colombia for each department

| Department | *Leishmania* species | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Lp | Lb | Lm | Lg | Li | La | Lco | Leq | Lla |
| Amazonas | | | | x | | | | | |
| Antioquia | x | x | x | x | | x | x | x | x |
| Arauca | x | | | | | | | | |
| Bolívar | x | x | | | x | | | | |
| Boyacá | x | x | | x | x | x | | | |
| Caldas | x | x | x | | x | | | | |
| Caquetá | x | x | x | x | | | | | |
| Casanare | x | x | x | | | | | | |
| Cauca | x | x | x | | | | | | |
| Cesar | | x | | | | | | | |
| Chocó | x | x | | | | x | | | |
| Córdoba | x | x | | | x | | | | |
| Cundinamarca | x | x | x | | x | | | | |
| Guainía | x | x | | | | | | | |
| Guaviare | x | x | x | x | | | | | |
| Huila | x | x | | | x | | | | |
| La Guajira | | x | | x | x | | | | |
| Magdalena | x | x | | | | | | | |
| Meta | x | x | x | x | x | x | | | |

*Lp: L. (V.) panamensis; Lb: L. (V.) braziliensis; Lm: L. (L.) mexicana; Lg: L. (V.) guyanensis; Li: L. (L.) infantum; La: L. (L.) amazonensis; Lco: L. (V.) colombiensis; Leq: (L. (V.) equatorensis; Lla: L. (V.) lainsoni*

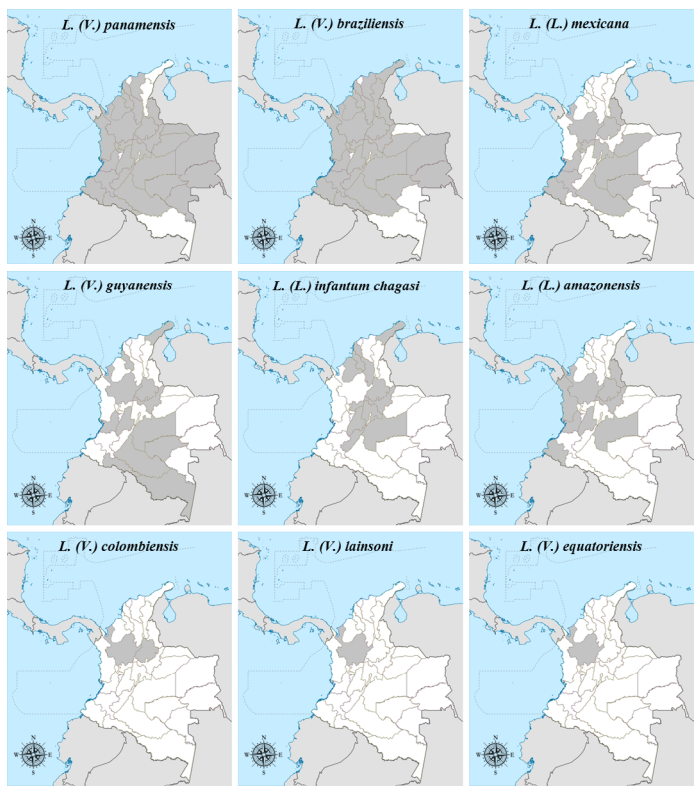



**Figure 1.** Geographical distribution by department of *Leishmania* species reported in Colombia, 1985-2017

*Leishmania* (*V.*) *braziliensis* was reported in organisms from 26 departments. According to the 26 studies in which it was identified, the departments with the highest number of reports of this species are Meta (10/26), Cundinamarca (6/26) and Caquetá (6/26). At the municipality level, *L.* (*V.*) *braziliensis* was reported in 12 municipalities in the departments of Antioquia, Bolívar, Boyacá, Cauca, Nariño, Norte de Santander, Sucre, Tolima, and Valle del Cauca. The departments without reports of this species are Amazonas, Atlántico, Arauca, Guainía, Quindío, and San Andrés and Providencia.

According to the 8 studies in which *L.* (*L.*) *mexicana* was identified, the circulation of this species has been reported in 13 departments, of which Antioquia (4/8), Nariño (3/8), and Cundinamarca (2/8) have the greatest number of reports. There were only 3 studies with information at the municipality level; *L.* (*L.*) *mexicana* was reported in the municipalities of Gómez Plata in the department of Antioquia (12), Puerto López and Puerto Lleras in Meta (6), and Samaniego in Nariño (9).

Although *L.* (*V.*) *guyanensis* has a small geographical distribution (12 departments), this species has a greater number of circulation reports than *L.* (*L.*) *mexicana*. *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* was identified in 20 of the 86 studies. The frequency of reports is higher in the departments of Caquetá (7/20), Tolima (5/20), and Putumayo (4/20), which are located in the southwestern part of the country. In total, there are 13 municipalities that reported the circulation of *L.* (*V.*) *guyanensis*, distributed in the departments of Amazonas, Caquetá, Meta, Putumayo, Sucre, Tolima, and Valle del Cauca.

*Leishmania* (*L.*) *infantum* was identified in 15 studies in organisms from 11 departments, including Córdoba (6/14), Cundinamarca (5/14), and Sucre (3/14), which have the highest number of reports of this species nationwide. The reports with detailed information of geographical origin come from 14 municipalities in 10 departments.

The 6 studies that report *L.* (*L.*) *amazonensis* indicate that the geographical distribution of this species is limited to the following 9 departments: Antioquia, Boyacá, Chocó, Meta, Nariño, Norte de Santander, Santander, Tolima, and Valle del Cauca. Of these, the department of Meta has the highest number of reports (4/6). In total, there are 12 municipalities in which *L.* (*L.*) *amazonensis* has been reported, distributed in the departments of Antioquia, Chocó, Meta, Nariño, Santander, Tolima, and Valle del Cauca.

To date, there are only two reports of *L.* (*V.*) *colombiensis* in the country (6,14). The samples came from patients from Río Grande and San Carlos municipalities of the department of Antioquia as well as from sand flies in the municipalities of El Carmen and San Vicente de Chucurí in Santander.

*Leishmania* (*V.*) *lainsoni* and *L.* (*V.*) *equatorensis* were recently reported by Ramirez, *et al.*, both identified from patients from the region of Antioquia (6).

Studies with less detailed information on the origin of the patients report the circulation of *L.* (*V.*) *braziliensis* and *L.* (*V.*) *panamensis* in the Amazon, Andean, Pacific and Orinoquia regions and *L.* (*V.*) *guyanensis* in the Amazon and Andean regions (15). Likewise, the distributions of *L.* (*V.*) *panamensis* and *L.* (*V.*) *braziliensis* were reported in the Amazonas, Atrato, Cauca, Magdalena, Mira, Orinoco, Patía, and San Juan river basins, whereas *L.* (*V.*) *guyanensis* was reported in the Amazonas river basin (7,16).

### *Species typing techniques*

To date, the parasites of *Leishmania* spp. in Colombia have been identified using different methods, including isoenzyme pattern analysis, monoclonal antibody typing, and other molecular biology techniques. Multi-Locus Enzyme Electrophoresis (MLEE) has been the most widely used technique for the identification of *Leishmania* spp. parasites in Colombia (4,17). MLEE is also used as a standard reference method for the confirmation of study findings (5,18).

In recent years, techniques based on the amplification of DNA using PCR, such as Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (19), have been valuable in the identification of these parasites and in the analysis of nucleotide sequences (6,10,20). In studies that use PCR for identification, the power of discrimination between species varies according to the molecular target. In reports in which species are identified to the genus, subgenus or species complex level, specific primers directed to kDNA minicircles were used (21,22). Other molecular targets that allow the discrimination of *Leishmania* species are the *hsp70* gene (18,19), the cytochrome b gene (*Cyt b*) (6,20), the *7SLRNA* gene (10,23) and the internal transcribed spacer 1 (ITS1) (18), and 16S rRNA (24).

### *Clinical forms and their etiological agents*

*Leishmania* species in Colombia have been identified primarily from parasites isolated from lesions of cutaneous leishmaniasis. In total, there are 36 studies that used samples from patients with this clinical form. The incidences predominated, according to the number of reports, in the departments of Antioquia (10/36), Nariño (9/36), Meta (8/36), Tolima (8/36), Chocó (7/36), and Valle del Cauca (7/36).

The typing of species in the cutaneous leishmaniasis cases resulted in the identification of *L.* (*V.*) *panamensis* as the most frequent causative agent of this clinical form. This was followed by *L.* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*V.*) *guyanensis*, *L.* (*L.*) *mexicana*, *L.* (*L.*) *amazonensis* and, with the same number of reports, *L.* (*L.*) *infantum*, *L.* (*V.*) *colombiensis*, *L.* (*V.*) *lainsoni,* and *L.* (*V.*) *equatorensis*.

Rodríguez, *et al.*, in 1985, and Corredor, *et al.*, in 1990, reported the identification of *L.* (*L.) mexicana* and *L.* (*L.*) *amazonensis* (4,17) from patients with diffuse cutaneous leishmaniasis from the departments of Meta and Nariño.

To date, there are few studies that include the typing of *Leishmania* spp. from patients with mucosal leishmaniasis in Colombia (25-27). Cases of mucosal leishmaniasis were reported in the departments of Caquetá, Chocó, Cundinamarca, Meta, Nariño, Putumayo, and Valle del Cauca. Only *L.* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*V.*) *panamensis,* and *L.* (*V.*) *guyanensis* have been identified as etiological agents of mucosal leishmaniasis.

Similarly, reports of species identified from patients with visceral leishmaniasis are scarce. Two papers have been published; the first, by Corredor, *et al*., does not indicate the geographical origin of the patient (4). The second study, by Mestra, *et al*., reported the development of visceral leishmaniasis in a patient with renal transplantation in Medellín (28). The genotyping of *Leishmania* species in these studies resulted in the identification of *L.* (*L.*) *infantum* (4) and *L.* (*L.*) *mexicana* (28).

### *Natural infection of sand flies*

Twenty-three studies were published between 1987 and 2018 that reported the natural infection by *Leishmania* spp. in 15 species of sand flies from 13 departments (table 2). *Lutzomyia evansi*, *Lu. longipalpis*, *Lu. spinicrassa* and *Lu. trapidoi* were the most frequently reported species of sandflies. Of the 9 *Leishmania* species reported in the country, only *L.* (*V.*) *panamensis*, *L.* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*V.*) *guyanensis*, *L.* (*L.*) *infantum,* and *L.* (*V.*) *colombiensis* have been identified from sandflies (table 3).

**Table 2.** Reports of natural sand fly infection in Colombia

| Sand fly | *Leishmania* species | Incrimination as vector according to WHO | Department | Reference |
|---|---|---|---|---|
| *Lutzomyia antunesi* | *Leishmania* spp. | No | Meta | (22) |
| *Lu. cayennensis cayennensis* | *L. (L.) infantum* | No | Sucre | (24) |
| | *Leishmania* spp. | | Córdoba | (33) |
| *Lu. evansi* | *L.(V.) braziliensis* | No | Bolívar | [a] |
| | | | Sucre | [b] |
| | *L. (L.) infantum* | Yes | Bolívar | [a] |
| | | | Córdoba | (31-33) |
| *Lu. flaviscutellata* | *Leishmania* spp. | Yes, for *L. (L.) amazonensis* | Meta | (22) |
| *Lu. gomezi* | *L. (V.) panamensis* | Yes | Boyacá | (36) |
| | *Leishmania* spp. | Yes | Córdoba | (33) |
| | | | Meta | (22) |
| *Lu. hartmanni* | *L. (V.) colombiensis* | Yes | Santander | (14) |
| | *Leishmania* spp. | Yes | Antioquia, Santander | (4) |
| *Lu. longiflocosa* | *L. (V.) guyanensis* | Yes | Tolima | (10) |
| | *Leishmania* spp. | Yes | Norte de Santander | [c] |
| *Lu. longipalpis* | *L. (V.) panamensis* | Yes | Cundinamarca | (6) |
| | *L. (L.) infantum* | Yes | Cundinamarca | (6,34,35) |
| | *Leishmania* spp. | Yes | Santander | (37) |
| *Lu. panamensis* | *L. (V.) panamensis* | Yes | Boyacá | (36) |
| | *Leishmania* spp. | Yes | Meta | (22) |
| *Lu. shannoni* | *L. (V.) colombiensis* | Yes | Santander | (6) |
| *Lu. spinicrassa* | *L. (V.) braziliensis* | Yes | Antioquia, Meta | (18) |
| | | | Norte de Santander | (30) |
| *Lu. trapidoi* | *L. (V.) panamensis* | Yes | Antioquia, Meta, | (18) |
| | | | Nariño, Santander | (29, 18) |
| | | | Tolima | (30) |
| | *SubgenusViannia* | Yes | Risaralda | (11) |
| *Lu. umbratilis* | *L. (V.) guyanensis* | Yes | Amazonas | (30) |
| | | | Boyacá, Santander | (18) |
| *Lu. yuilli* | *L. (V.) panamensis* | Yes | Boyacá | (36) |
| *Warileya rotundipennis* | *SubgenusViannia* | No | Risaralda | (11) |

[a] Romero-Ricardo L, Pérez-Doria A, Rodríguez J, Vergara J, Montesino A, Martínez L, et al. *Lutzomyia evansi* como vector permisivo de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania infantum* en el departamento de Bolívar, Colombia. Memorias, XVI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Biomédica. 2015;35(Supl.4):185.

[b] Pérez A, Romero L, Martínez L, Rivero M, Bejarano E. Aislamiento y tipificación de una cepa de *Leishmania (Viannia) braziliensis* a partir de *Lutzomyia evansi* en el municipio de Colosó, Sucre. Memorias, XVI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Biomédica.2 015;35(Supl.4):112-3.

[c] Cárdenas R, Gutiérrez R, Cabrera O, Santamaría E, Parada H, Mendoza F, et al. *Lutzomyia longiflocosa (Psychodidae, Phlebotominae)* infectado naturalmente con *Leishmania* spp. en una región endémica de leishmaniasis tegumentaria americana. Memorias, XX Congreso Latinoamericano de Parasitología. Biomédica. 2011;31:270.

**Table 3.** Reports of natural infection of animal hosts in Colombia

| Order | Reservoir | *Leishmania* species | Department | Reference |
|---|---|---|---|---|
| Rodentia | *Akodon* spp. | *L. (V.) braziliensis* | Norte de Santander | (6) |
| | | *L. (V.) panamensis* | No data | (4) |
| | *Coendou* spp. | *L. (V.) panamensis* | No data | (4) |
| | *Proechimys canicollis* | *L. (L.) infantum* | Córdoba, Sucre | (38) |
| | *Rattus rattus* | *L. (V.) panamensis* | No data | (4) |
| | | *L. (V.) braziliensis complex* | Valle del Cauca | (21) |
| | *Melanomys caliginosus* | *L. (V.) braziliensis complex* | Valle del Cauca | (21) |
| | *Microryzomys minutus* | | | |
| | *Oecomystrinitatus* | Subgenus *Viannia* | Tolima | (39) |
| | *Sigmodon hispidus* | | | |
| | *Zygodontomys brunneus* | | | |
| Didelphimorphia | *Metachirus nudicaudatus* | *L. (V.) panamensis* | No data | (4) |
| | *Didelphis marsupialis* | *L. (V.) panamensis* | No data | (4) |
| | | | Boyacá | (18) |
| | | | Chocó | ([a]) |
| | | *L. (L.) infantum* | Cundinamarca | (4,6) |
| Carnivora | | | Córdoba, Sucre | (38) |
| | | | Huila | (6) |
| | | *L. (L.) mexicana* | Antioquia, Santander | (18) |
| | | *L. (V.) braziliensis complex* | Valle del Cauca | (21) |
| | | *Subgenus Viannia* | Tolima | (39) |
| | | *Leishmania spp.* | Bolívar | ([b]) |
| | *Micoureus demerarae* | *L. (V.) braziliensis complex* | Valle del Cauca | (21) |
| | | *L. (V.) panamensis* | Huila | (6) |
| | | *L. (V.) braziliensis* | Valle del Cauca, Nariño | (40) |
| | | | Tolima | (23) |
| | | | Sucre | ([c]) |
| | *Canis familiaris* | *L. (V.) guyanensis* | Meta | (41) |
| | | | Tolima | (23,36) |
| | | | Sucre | ([c]) |
| | | *L. (L.) infantum* | Cundinamarca | (34,40) |
| | | *L. (L.) amazonensis* | Tolima | (6) |
| | | *Leishmania spp.* | Santander | ([d]) |
| Pilosa | *Choloepus hoffmanni* | *L. (V.) panamensis* | Valle del Cauca | (42) |
| Lagomorpha | *Sylvilagus brasiliensis* | *L. (V.) braziliensis complex* | Valle del Cauca | (21) |
| Perissodactyla | *Equus asinus* | *L. (V.) braziliensis* | No data | (4) |

[a] Carrillo-Bonilla L, Vélez I, Vélez-Mira A, Boite M, Cupolillo E. Estudio ecoepidemiológico de *Didelphis marsupialis* y *Canis familiaris* como posibles reservorios de *Leishmania panamensis* en un ciclo selvático y periurbano de Colombia. Memorias, XVI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Biomédica. 2015: 35(Supl.4):158-9.

[b] Zambrano P, Ayala M, Fuya P, Pérez J, Triana O, Cantillo-Barraza O. Estudios de reservorios silvestres en un brote de leishmaniasis visceral urbana en Cartagena, departamento de Bolívar. Memorias, XX Congreso Latinoamericano de Parasitología. Biomédica. 2011;31:297.

[c] Rivero M, Rodríguez J, Meza E, Pérez-Doria A, Bejarano E. Primer hallazgo de *Leishmania guyanensis* y *Leishmania braziliensis* en perros asintomáticos del foco urbano de leishmaniasis del municipio de Ovejas, Sucre. Memorias, XVI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical, Biomédica. 2015;35(Supl.4):113.

[d] Márquez LL, Luna KP, Ángulo VM. Detección de infección por *L. chagasi* en una población canina de un foco de leishmaniosis visceral en Santander. Biomédica. 2003;23:115.

Natural infection by *L.* (*V.*) *panamensis*, *L.* (*V.*) *braziliensis,* and *L.* (*V.*) *guyanensis* was detected primarily in *Lu. trapidoi* (18,29,30), *Lu. spinicrassa* (4,18,30), and *Lu. umbratilis* (4,10,18,30), respectively, whereas reports of natural infection by *L.* (*L.*) *infantum* occurred primarily in *Lu. evansi* (31-33) and *Lu. longipalpis* (4,6,34,35). Infection with *L.* (*V.*) *colombiensis* in sand flies has only been reported in *Lu. hartmani* (14) and *Lu. shannoni* (6). Other species of sand flies in which a natural infection has been reported include *Lu. longiflocosa* by *L.* (*V.*) *guyanensis* (10), *Lu. cayennensis* by *L.* (*L.*) *infantum* (24), *Warileya rotundipennis* infected by parasites of the subgenus *Viannia* (11), and *Lu. antunesi*, identified at the genus level (22).

### *Natural infection of animal hosts*

Since 1988, there have been 19 studies involving the isolation and identification of *Leishmania* species in animal hosts in Colombia. The natural infection has been described in 16 mammalian species, among which rodents and marsupials predominate. Nine mammalian species have only a single report of natural infection, whereas others, such as *Canis familiaris* and *Didelphis marsupialis*, have several reports of infection. The typing of *Leishmania* spp. in these animals led to the identification of *L.* (*V.*) *panamensis*, *L.* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*V.*) *guyanensis*, *L.* (*L.*) *infantum*, *L.* (*L.*) *mexicana,* and *L.* (*L.*) *amazonensis*. Of these, *L.* (*V.*) *panamensis* has been identified in 7 of the 16 species of mammals, including *D. marsupialis*, *C. familiaris*, *Choloepus hoffmanni*, *Rattus rattus,* and species of the genera *Akodon* and *Coendou* (table 3).

*Leishmania* (*V.*) *braziliensis* and *L.* (*V.*) *guyanensis* have been primarily isolated from *C. familiaris*. Of the species of subgenus *Leishmania*, *L.* (*L.*) *infantum* has the highest number of reports of natural infection in animal hosts, including *D. marsupialis*, *C. familiaris* and *Proechimys canicollis* (table 3).

## Discussion

In this review, the 86 reports of *Leishmania* species in Colombia were compiled (Annex 1). Our goal was to characterize the geographical distribution of the species causing the different clinical forms and to map the natural infection of sand flies and other animal hosts. This information is valuable to health authorities because it allows the determination of transmission foci so that proper prevention measures may be established. Additionally, it provides information for the development of new research related to the *Leishmania* species in Colombia.

In addition, this review enabled us to describe the geographical distribution of the nine species circulating in 29 of the 32 departments of the country, expanding the area described by Ramírez, *et al*., which included information only from 23 departments (6).

One limitation of this work is that in most of the studies included the geographical origin of the samples analyzed was not specified in detail, which is why the described distribution is limited to the department. Thus, it is not possible to relate the location of the species to the geographical and climatological variations of the country. If future reports provide the exact location of the samples, such as village (*vereda*) and municipality, the precise geographical distribution of the parasite species could be updated.

The circulation of nine species of *Leishmania* makes Colombia one of the countries harboring the highest number of species. According to the established geographical distribution, the departments of Antioquia, Santander, and Meta have the highest number of circulating species and the

highest number of species identification reports. These three departments accounted for 28.8% of the cases of leishmaniasis reported to the *Instituto Nacional de Salud* during the year 2016, of which Antioquia reported the second highest number of cases of cutaneous leishmaniasis, and Meta reported the highest number of cases of mucosal leishmaniasis (2).

Among the species identified as causing cutaneous leishmaniasis in the country, reports of *L.* (*L.*) *infantum* occurred in patients from the departments of Boyacá, Caldas, Cundinamarca, La Guajira, Meta, and Santander (6). This article does not describe the clinical characteristics of the cases and indicates only that the patients included had cutaneous leishmaniasis. Despite the close relationship between *L.* (*L.*) *infantum* and visceral leishmaniasis, cases of cutaneous leishmaniasis by this species have been previously reported in countries in Latin America, including Brazil (43) and Nicaragua (44).

Twenty-seven percent of the species identification reports were derived from sand fly studies. Natural infection was detected in 15 species, of which 11 are listed by WHO as confirmed vectors of leishmaniasis in Colombia (45). Among these, *Lu. evansi* and *Lu. longipalpis* are confirmed vectors of *L.* (*L.*) *infantum* and *Lu. trapidoi¸ Lu. spinicrassa* and *Lu. umbratilis* are confirmed vectors of *L.* (*V.*) *panamensis*, *L.* (*V.*) *braziliensis,* and *L.* (*V.*) *guyanensis*, respectively (45). It is important to highlight the variety of sand fly species (*Lu. trapidoi*, *Lu. gomezi*, *Lu. panamensis*, *Lu. yuilli* and *Lu. longipalpis*) in which a natural infection by *L.* (*V.*) *panamensis* was detected, as this may be related to its wide distribution in the country.

The characterization of *Leishmania* spp. in mammals has been the least explored in the country. Of the animal species with reports of natural infection, many species of *Leishmania* have been identified in *C. familiaris* (table 3), which is listed as the main reservoir of *L.* (*L.*) *infantum.* Although there is evidence that this host plays a role in the transmission of parasites that cause cutaneous leishmaniasis, it is unknown whether *C. familiaris* acts as a reservoir or if it is an incidental host. Several species of mammals infected by *Leishmania* parasites have been reported in Colombia (table 3). Of the nine species of *Leishmania* circulating in Colombia, infection by *L.* (*V.*) *colombiensis*, *L.* (*V.*) *lainsoni,* and *L.* (*V.*) *equatorensis* have not been reported in animal hosts. As in Colombia, there are few reports of natural infection by these species in other Latin American countries.

This report gathered published information regarding the distribution of *Leishmania* spp. in Colombia from 1985 to 2017 and reveals that the available information is limited. Therefore, it is necessary to propose studies to identify the circulating species in endemic sites throughout the country that have not yet been reported and thus contribute to the control of the disease.

A possible strategy to update the species distribution map of *Leishmania* spp. in Colombia is to compile information on species typing and distribution in the country and thus create a consolidated map of available information. This would allow the areas in which there is no information on circulating species to be identified. It would be valuable to compare the distribution of the parasite species and the distribution of its vectors in the country (46).

**Acknowledgments**

We thank the Editorial Committee of the *Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta* for its constructive comments that helped to improve the manuscript, and Eliana Cristancho, the librarian at the Center, for her recommendations for conducting the literature search.

## References


1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, *et al*. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PloS ONE. 2012;7:e35671. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671
2. Intituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal. Diciembre 2016. Reporte No. 52. Fecha de consulta: 15 de marzo de 2017. Disponible en: http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2016%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2052%20-.pdf
3. World Health Organization. Leishmaniasis in high-burden countries: An epidemiological update based on data reported in 2014. Wkly Epidemiol Rec. 2016;91:287-96.
4. Corredor A, Kreutzer RD, Tesh RB, Boshell J, Palau MT, Cáceres E, *et al*. Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1990;42:206-14. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.206
5. Ovalle CE, Porras L, Rey M, Ríos M, Camargo YC. Distribución geográfica de especies de Leishmania aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta, ESE, 1995-2005. Biomédica. 2006;26:145-51. https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1508
6. Ramírez JD, Hernández C, León CM, Ayala MS, Flórez C, González C. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of cutaneous leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. Sci Rep. 2016;6:28266. https://doi.org/10.1038/srep28266
7. Saravia NG, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama L, Valencia AZ, *et al*. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania viannia* in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2002;66:738-44. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.738
8. Patiño LH, Méndez C, Rodríguez O, Romero Y, Velandia D, Alvarado M, *et al*. Spatial distribution, *Leishmania* species and clinical traits of cutaneous leishmaniasis cases in the Colombian army. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11:e0005876. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005876
9. Arroyo C, Garzón J. Investigación de un foco de leishmaniasis cutánea en la zona andina del departamento de Nariño. Biomédica. 1995;16:25-31. https://doi.org/10.7705/biomedica.v16i1.887
10. Ferro C, Marín D, Góngora R, Carrasquilla MC, Trujillo JE, Rueda NK, *et al*. Phlebotomine vector ecology in the domestic transmission of American cutaneous leishmaniasis in Chaparral, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2011;85:847-56. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0560
11. Moreno M, Ferro C, Rosales-Chilama M, Rubiano L, Delgado M, Cossio A, *et al*. First report of *Warileya rotundipennis* (Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected with *Leishmania (Viannia)* in a focus of cutaneous leishmaniasis in Colombia. Acta Tropica. 2015;148:191-6. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.017
12. Sierra D, Ochoa M, Calle JI, García G, Colorado D, Vélez ID. *Leishmania (Leishmania) mexicana* en el corregimiento de San Matías, municipio de Gómez Plata, Antioquia, Colombia. Biomédica. 2006;26:232-5. https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1517
13. Vélez ID, Carrillo LM, López L, Rodríguez E, Robledo SM.An epidemic outbreak of canine cutaneous leishmaniasis in Colombia caused by *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*. Am J Trop Med Hyg. 2012;86:807-11. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0408
14. Kreutzer RD, Corredor A, Grimaldi G, Grogl M, Rowton ED, Young DG, *et al*. Characterization of *Leishmania colombiensis* Sp. N (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. Am J Trop Med Hyg. 1991;44:662-75. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.662
15. Fernández OL, Díaz-Toro Y, Ovalle C, Valderrama L, Muvdi S, Rodríguez I, *et al*. Miltefosine and antimonial drug susceptibility of *Leishmania Viannia* species and populations in regions of high transmission in Colombia. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e2871. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002871
16. Saravia NG, Segura I, Holguín AF, Santrich C, Valderrama L, Ocampo C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1998;59:86-94. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.86
17. Rodríguez G, Corredor A, Cáceres E, Cassiano G, Arroyo C, Palau M, *et al*. Leishmaniasis difusa. Biomédica. 1985;5:95-111. https://doi.org/10.7705/biomedica.v5i3-4.1909

18. Hernández C, Álvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez JD. Identification of six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. Parasit Vectors. 2014;7:501. https://doi.org/10.1186/s13071-014-0501-y

19. Posada L, Vélez A, Acosta L, Cadena H, Agudelo D, Vélez I. Descripción de un foco endémico de leishmaniasis cutánea en Puerto Valdivia, Antioquia, Colombia. CES Salud Pública. 2014;5:3-10.

20. Martínez LP, Rebollo JA, Luna AL, Cochero S, Bejarano EE. Molecular identification of the parasites causing cutaneous leishmaniasis on the Caribbean coast of Colombia. Parasitol Res. 2010;106:647-52. https://doi.org/10.1007/s00436-009-1712-6

21. Alexander B, Lozano C, Barker DC, McCannb SHE, Adler GH. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. Acta Trop. 1998;69:41-50. https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00114-9

22. Vásquez-Trujillo A, González-Reina AE, Góngora-Orjuela A, Prieto-Suárez E, Palomares JE, Buitrago-Álvarez LS. Seasonal variation and natural infection of *Lutzomyia antunesi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), an endemic species in the Orinoquia region of Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108:463-9. https://doi.org/10.1590/S0074-0276108042013011

23. Santaella J, Ocampo CB, Saravia NG, Méndez F, Góngora R, Gómez MA, *et al*. *Leishmania (Viannia)* infection in the domestic dog in Chaparral, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2011;84:674-80. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0159

24. Cochero S, Anaya Y, Díaz Y, Paternina M, Luna A, Paternina L, *et al*. Infección natural de *Lutzomyia cayennensis cayennensis* con parásitos tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Los Montes de María, Colombia. Rev Cubana Med Trop. 2007;59:35-9.

25. Santrich C, Segura I, Arias AL, Saravia NG. Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. Am J Trop Med Hyg. 1990;42:51-5. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.51

26. Saravia NG, Holguín AF, McMahon-Pratt D, D'Alessandro A. Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia - *Leishmania-braziliensis* subspecies diversity. Am J Trop Med Hyg. 1985;34:714-20. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1985.34.714

27. Weigle KA, Saravia NG, de Dávalos M, Moreno LH, D'Alessandro A. *Leishmania braziliensis* from the Pacific coast region of Colombia: Foci of transmission, clinical spectrum and isoenzyme phenotypes. Am J Trop Med Hyg. 1986;35:722-31. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1986.35.722

28. Mestra L, López L, Robledo SM, Muskus CE, Nicholls RS, Vélez ID. Transfusion-transmitted visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana* in an immunocompromised patient: A case report. Transfusion. 2011;51:1919-23. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03092.x

29. Travi BL, Montoya J, Solarte Y, Lozano L, Jaramillo C. Leishmaniasis in Colombia. I. Studies on the phlebotomine fauna associated with endemic foci in the Pacific Coast region. Am J Trop Med Hyg. 1988;39:261-6. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.39.261

30. Young DG, Morales A, Kreutzer RD, Alexander JB, Corredor A, Tesh RB. Isolation of *Leishmania-braziliensis* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) from cryopreserved Colombian sand flies (Diptera, Psychodidae). J Med Entomol. 1987;24:587-9. https://doi.org/10.1093/jmedent/24.5.587

31. Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jaramillo C, Llano R, Vélez ID. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Colombia. J Med Entomol. 1996;33:278-85. https://doi.org/10.1093/jmedent/33.3.278

32. Travi BL, Vélez ID, Brutus L, Segura I, Jaramillo C, Montoya J. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990;84:676-7. https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90142-2

33. Vélez ID, Travi B, Gallego J, Palma G, Agudelo S, Montoya J, *et al*. Evaluación ecoepidemiológica de la leishmaniosis visceral en la comunidad indígena Zenú de San Andrés de Sotavento, Córdoba: primer paso para su control. Revista Colombiana de Entomología. 1995;21:111-22.

34. Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Morales A, de Carrasquilla CF, Young DG, *et al*. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1989;40:480-6. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.40.480

35. Ferro C, Morrison AC, Torres M, Pardo R, Wilson ML, Tesh RB. Age structure, blood-feeding behavior, and *Leishmania chagasi* infection in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. J Med Entomol. 1995;32:618-29. https://doi.org/10.1093/jmedent/32.5.618

36. Santamaría E, Ponce N, Zipa Y, Ferro C. Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con *Leishmania (Viannia) panamensis* en dos focos endémicos en el occidente de Boyacá, piedemonte del valle del Magdalena medio, Colombia. Biomédica. 2006;26:82-94. https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1503

37. Flórez M, Martínez JP, Gutiérrez R, Luna KP, Serrano VH, Ferro C, *et al*. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) en un foco suburbano de leishmaniosis visceral en el Cañón del Chicamocha en Santander, Colombia. Biomédica. 2006;26:109-20. https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1505

38. Travi BL, Osorio Y, Becerra MT, Adler GH. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1998;92:275-8. https://doi.org/10.1016/S0035-9203(98)91009-4

39. Ocampo CB, Ferro MC, Cadena H, Góngora R, Pérez M, Valderrama-Ardila CH, *et al*. Environmental factors associated with American cutaneous leishmaniasis in a new Andean focus in Colombia. Trop Med Int Health. 2012;17:1309-17. https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2012.03065.x

40. Travi BL, Tabares CJ, Cadena H. *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in two Colombian dogs: A note on infectivity for sand flies and response to treatment. Biomédica. 2006;26:249-53. https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1520

41. Vásquez-Trujillo A, Gonzáles A, Góngora-Orjuela A, Cabrera O, Santamaría E, Buitrago-Álvarez L. Identificación de *Leishmania (Viannia) guyanensis* en caninos, en zona rural del municipio de Villavicencio, Meta, Colombia. Orinoquia. 2008;12:173-81.

42. Loyola EG, Alzate A, Sánchez A, González A. Epidemiology of a natural focus of *Leishmania-braziliensis* in the pacific lowlands of Colombia. III. Natural infections in wild mammals. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1988;82:406-7. https://doi.org/10.1016/0035-9203(88)90136-8

43. Castro LS, Franca Ade O, Ferreira Ede C, Hans Filho G, Higa Junior MG, Gontijo CM, *et al*. *Leishmania infantum* as a causative agent of cutaneous leishmaniasis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2016;58:23. https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658023

44. Noyes H, Chance M, Ponce C, Ponce E, Maingon R. *Leishmania chagasi*: Genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. Exp Parasitol. 1997;85:264-73. https://doi.org/10.1006/expr.1996.4133

45. World Health Organization. Control of the Leishmaniases. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of Leishmaniases. Tech Rep Ser 949. Geneva: WHO; 2010. p. 1-186.

46. Ferro C, López M, Fuya P, Lugo L, Cordovez JM, González C. Spatial distribution of sand fly vectors and eco-epidemiology of cutaneous leishmaniasis transmission in Colombia. PloS One. 2015;10:e0139391. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139391

Biomédica 2019;39:291-9
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4094

Artículo original

# El caseinato de sodio y la caseína *α* inhiben la proliferación de la línea celular mieloide de ratón 32D clone 3 (32Dcl3) mediante el TNF-*α*.

Benny Weiss-Steider[1], Yolanda Córdova[1], Itzen Aguiñiga-Sánchez[1], Edgar Ledesma-Martínez[1], Vanihamin Domínguez-Melendez[2], Edelmiro Santiago-Osorio[1]

[1] Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México
[2] Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Centro de Estudios y Servicios en Salud, Universidad Veracruzana, Veracruz, México

**Introducción.** Se ha demostrado que el caseinato de sodio y sus componentes (caseínas α, β y κ) inhiben la proliferación de la línea celular hematopoyética de ratón 32D clone 3 (32Dcl3) e inducen su diferenciación hacia macrófagos. Se sabe que la caseína α induce la producción de IL-1β y que esta última citocina inhibe la proliferación celular mediante la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), pero se desconoce si el caseinato de sodio y las caseínas inducen la producción de TNF y si este es el responsable de la inhibición de la proliferación.
**Objetivo.** Evaluar si el caseinato de sodio y las caseínas α, β y κ inhiben la proliferación de la línea celular 32Dcl3 mediante la producción de TNF-α.
**Materiales y métodos.** Se usaron diferentes concentraciones de caseinato de sodio y de las caseínas α, β y κ en las células 32Dcl3. Posteriormente, se evaluaron la viabilidad celular mediante una prueba con el MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol], la inducción de apoptosis con la citometría de flujo y la síntesis del TNF-α con el ELISA. Además, se hicieron pruebas de neutralización con anti-TNF-α en células 32Dcl3 tratadas con caseinato de sodio y caseína α, y se evaluó la proliferación celular.
**Resultados.** Se encontró que el caseinato de sodio y las caseínas α, β y κ reducían la proliferación de la línea celular 32Dcl3 sin afectar la viabilidad, y que solo el caseinato y la caseína α inducían la apoptosis y la liberación al medio de TNF-α. La proliferación de células 32Dcl3 tratadas con caseinato y caseína α se restableció al usar anticuerpos anti-TNF-α.
**Conclusión.** El TNF-α fue el principal responsable de la inhibición de la proliferación en las células 32Dcl3 tratadas con caseinato de sodio o caseína α.

**Palabras clave:** caseínas; hematopoyesis; proliferación celular; apoptosis; factor de necrosis tumoral alfa.

**Sodium caseinate and alfa-casein inhibit proliferation of the mouse myeloid cell line 32D clone 3 (32Dcl3) via TNF-*α*.**

**Introduction:** Sodium caseinate (CS) and its components (alpha-casein, beta-casein, and kappa-casein) have been shown to inhibit the proliferation of the mouse hematopoietic 32D clone 3 (32Dcl3) cell line and induce its differentiation into macrophages. It is well-known that alpha-casein induces IL-1β production and that this cytokine inhibits the proliferation via the production of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), but it is not known if CS and the caseins inhibit the proliferation via TNF-alpha production.
**Objective:** To evaluate if CS and alpha-casein, beta-casein and kappa-casein inhibit the proliferation on 32Dcl3 cell line via TNF-alpha.
**Materials and methods:** We used different concentrations of CS, alpha-casein, beta-casein and kappa-casein in 32Dcl3 cells to evaluate cell proliferation. We assessed cell viability by MTT, induction to apoptosis by flow cytometry, and TNF-alpha synthesis by ELISA. Additionally, we performed anti-TNF-alpha neutralization assays on 32Dcl3 cells treated with CS and alpha-casein and we evaluated proliferation.
**Results:** The results showed that CS, alpha-casein, beta-casein, and kappa-casein reduced proliferation of the 32Dcl3 cell line without affecting the viability and that only CS and alpha-casein induced apoptosis and the release of TNF-alpha. The 32Dcl3 cells treated with CS and alpha-casein reestablished their proliferation by using anti-TNF-alpha antibodies.
**Conclusion:** TNF-alpha was the main responsible for the inhibition of proliferation in 32Dcl3 cells treated with CS or alpha-casein.

**Keywords:** Caseins; hematopoiesis; cell proliferation; apoptosis; tumor necrosis factor-alpha.

**Recibido:** 04/10/17
**Aceptado:** 18/09/18
**Publicado:** 19/09/18

**Citación:**
Weiss-Steider B, Córdova Y, Aguiñiga-Sánchez I, Ledesma-Martínez E, Domínguez-Meléndez V, Santiago-Osorio E. El caseinato de sodio y la caseína α inhiben la proliferación de la línea celular mieloide de ratón 32D cl3 mediante el factor de necrosis tumoral α. Biomédica. 2019;39:291-9. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4094

**Correspondencia:**
Edelmiro Santiago-Osorio, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Batalla 5 de mayo s/n, esquina Fuerte de Loreto, Col. Ejército de Oriente, Iztapalapa, C.P. 09230, Ciudad de México, México
Teléfono: (+52) 555623 0791
edelmiro@unam.mx

**Contribución de los autores:**
Benny Weiss-Steider: diseño experimental, análisis de datos y redacción del artículo
Yolanda Córdova: desarrollo experimental en cultivos de células 32D cl3 para los análisis de proliferación, análisis mediante la técnica ELISA y análisis de datos
Itzen Aguiñiga-Sánchez: ensayos de citometría de flujo para el análisis de identificación de anexina V, análisis de datos y revisión del artículo
Edgar Ledesma-Martínez: asesoría en la estandarización de las técnicas empleadas, análisis de resultados y escritura del artículo
Edelmiro Santiago-Osorio: diseño, análisis de resultados y escritura del manuscrito
Todos los autores participaron en la revisión final del manuscrito.

**Financiación:**
Este trabajo se hizo con el apoyo del programa PAPIIT (IN217407, IN225610, IN220814, IN221017) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**Conflicto de intereses:**
Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

La leche y los productos lácteos son componentes importantes de la dieta humana e, históricamente, se les ha valorado por su aporte nutricional de aminoácidos (1). La leche bovina, la más frecuentemente consumida, está constituida por 3,6 % de proteínas, 4,1 % de grasas, 5,0 % de carbohidratos, menos de 1 % de vitaminas y minerales, y 86,6 % de agua (2).

De la fracción proteica, la caseína es el principal (80 %) componente y está presente en forma de micelas, partículas esféricas de dimensión no uniforme (3). La micela de la caseína está compuesta por cuatro subunidades polipeptídicas denominadas caseínas $\alpha_{s1}$, $\alpha_{s2}$, β y κ (4,5). En los últimos años se ha explorado su capacidad para influir en funciones hematopoyéticas normales (6) e, incluso, en la reacción inmunitaria de modelos animales por medio de la producción de citocinas como la IL-1β por parte de los macrófagos; de esta forma, la caseína puede actuar como reguladora del sistema inmunológico (7).

En este sentido, se ha observado que en las ratas alimentadas con caseína se reduce el desarrollo de tumores de colon, y se sugirió que dicho proceso involucraba al sistema inmunológico (8), en tanto que se ha reportado que la ingestión de caseína parece un evento obligado para la maduración del sistema inmunológico en las mucosas (9).

Por otro lado, se sabe que las casomorfinas, derivadas de la degradación proteolítica de las caseínas, inhiben la proliferación de las líneas celulares de cáncer de seno y de próstata (10,11). Además, las caseínas $\alpha_{s1}$, $\alpha_{s2}$, β y κ, y el caseinato de sodio, una sal que contiene las subunidades de la caseína, inhibieron la proliferación de las células mieloides 32D clone 3 (32Dcl3) de ratón al promover su diferenciación hacia macrófagos (12,13).

Se evidenció que el caseinato de sodio y las caseínas indujeron la expresión del ARN mensajero (ARNm) del CD115, receptor de membrana para el factor estimulante de colonias de macrófagos (*Macrophage-Colony Stimulating Factor*, M-CSF) –también conocido como receptor M-CSFR (*Macrophage-Colony Stimulating Factor Receptor*) o proto-oncogen c-fms (*Colony-Stimulating Factor-1 Receptor*)–, el cual es un marcador comúnmente asociado a macrófagos, en tanto que la caseína α y el caseinato de sodio promueven la síntesis de M-CSF, una citocina involucrada en la diferenciación y la función de monocitos y macrófagos (13).

Se sabe que la caseína α induce la producción de IL-1β (14) y que esta citocina inhibe la proliferación de las células 32Dcl3 mediante la producción del factor de necrosis tumoral α (TNF-α) (15,16), pero se desconoce si el caseinato de sodio y las caseínas inhiben la proliferación de las células 32Dcl3 mediante la producción de TNF-α.

En este estudio se analizó la posible inducción del TNF-α en las células 32Dcl3 por parte de las caseínas y su intervención en la inhibición de la proliferación. Los resultados indicaron que el caseinato de sodio y las subunidades de caseína inhibieron la proliferación, y que solo el caseinato de sodio y la caseína α estimularon la producción del TNF-α en las células 32Dcl3.

## Materiales y métodos

### *Citocinas y anticuerpos*

Se emplearon la interleucina-3 recombinante de ratón (rmIL-3), el factor de necrosis tumoral α recombinante de ratón (rmTNF-α) y el anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral α de ratón (anti-TNF-α) (R&D Systems, USA).

### *Cultivo celular*

La línea celular mieloide 32Dcl3 de ratón donada por T. Hoang (*Hematopoiesis and Leukemia Laboratory,* Montreal, Quebec, Canadá), se mantuvo en medio de cultivo *Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium* (IMDM, Gibco BRL, USA) adicionado con 10 % de suero fetal bovino previamente inactivado con calor (HyClone, Utah, USA), más 0,5 ng/ml de interleucina-3 recombinante de ratón (rmIL-3) como factor de crecimiento, mantenido a una temperatura de 37 °C y con 5 % de $CO_2$.

En estas condiciones, se cultivaron células con caseinato de sodio y sin él (2 mg/ml) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), y con caseínas α, β o κ (1 mg/ml) (Sigma, México) en placas de 96 pozos (Costar, Cambridge, MA, USA) con una densidad de 2 x $10^4$ células/ml. El medio condicionado se recolectó a las 72 horas de cultivo y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

### *Proliferación celular*

Para evaluar la proliferación se cultivaron 2 x $10^4$ células/ml con caseinato de sodio o sin él, y caseína α, β o κ en placas de 96 pozos (Corning NY, USA) en las condiciones antes señaladas durante 56 horas. Posteriormente, se adicionaron 0,5 µCi de [β-$^3$H]dTTP/ml timidina (*activity* 185 mbq, Amersham Pharmacia Biotech, UK) y las células se cosecharon 16 horas más tarde. Después de lavar y lisar las muestras, se adicionaron 2 ml de líquido de centelleo (Beckman, USA) y se cuantificó la emisión de luz en un contador de partículas beta (*beta counter*) (Beckman LS6500, USA).

### *Viabilidad celular*

Se determinó la presencia de células viables mediante una prueba con el bromuro de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol], para lo cual se adicionaron 20 µl de MTT (5 mg/ml de solución salina) al cultivo en placas de 96 pozos, y luego se incubó durante cuatro horas a 37 °C. Posteriormente, las células se lisaron y disolvieron con 100 µl de 0,04 N de ácido clorhídrico (HCl) en isopropanol, estableciendo la absorbancia a 590 nm en un lector de placas (Tecan Spectra, Austria).

### *Apoptosis*

Para detectar la presencia de células positivas para fosfatidilserina como criterio de positividad de las células apoptóticas, se utilizó el estuche PHN1018 de anexina-V-FITC™ (Biosource); la fluorescencia se analizó en un citómetro de flujo (Becton Dickinson, San José, CA), según los procedimientos estándar.

### *Prueba inmunoenzimática*

Para detectar la presencia de TNF-α en el medio condicionado de células con tratamiento de caseinato de sodio o caseínas y sin este, se utilizó el estuche KMC3012 de ELISA (Biosource, USA) conforme a las especificaciones del fabricante y se determinó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Tecan Spectra, Austria).

### *Neutralización del TNF-α en cultivos con caseinato de sodio o caseína α*

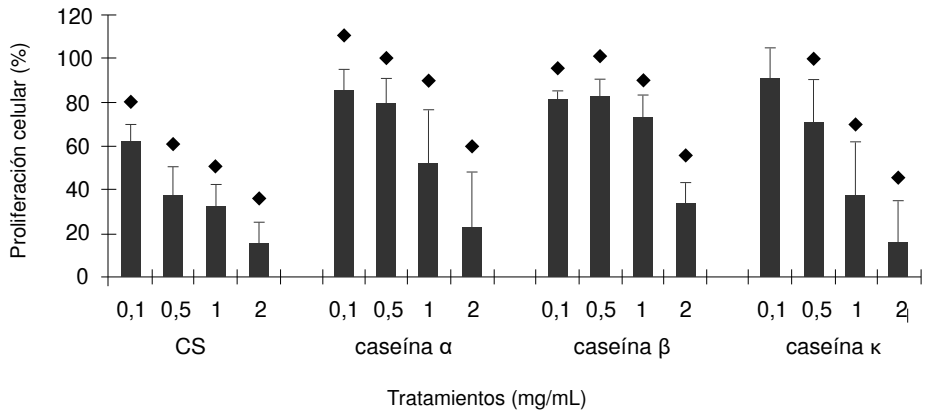
Para neutralizar la actividad del TNF-α en cultivos con caseinato de sodio o caseína α y sin estos, se adicionaron 2 x $10^4$ cel/ml de un anticuerpo neutralizador anti-TNF-α en placas de 96 pozos y se consideraron los

controles de rmTNF-α, rmTNF-α más el anticuerpo anti-TNF-α y únicamente anticuerpo anti-TNF-α, evaluando la proliferación como se ha indicado.

## Resultados

### *El caseinato de sodio y las caseínas α, β o κ inhiben la proliferación sin afectar la viabilidad de las células 32Dcl3.*

Para mostrar que el caseinato de sodio y las caseínas inhiben la proliferación de las células 32Dcl3, estas se cultivaron en presencia de 0,5 ng/ml de rmIL-3, con o sin caseinato de sodio, y las caseínas α, β o κ durante 72 horas. Los resultados evidenciaron que, a partir de 0,5 mg/ml de caseinato de sodio y de caseína α o κ y 0,1 mg/ml de caseína β, la proliferación celular se bloqueó significativamente (figura 1) sin afectar la viabilidad que, en todos los casos, fue superior al 90 % (cuadro 1).




♦ Resultados significativamente diferentes (p <0,05) en la prueba de Tukey

**Figura 1.** Proliferación de la línea celular 32D cl3 después de 72 horas de incubación en presencia de 0,5 ng/ml de rmIL-3, con o sin el inductor caseinato sódico y las caseínas α, β o κ en diferentes dosis. La proliferación se muestra como el porcentaje incorporado de timidina [3H] con respecto al control.

**Cuadro 1.** Porcentaje de viabilidad celular determinada mediante pruebas con MTT de la línea celular 32D cl3 tratada con caseinato de sodio y caseínas α, β y κ después de tres días de incubación. Cuantificación del TNF-α mediante ELISA en medios acondicionados de línea celular 32D cl3 sin inductor, caseinato de sodio o caseínas. Los datos muestran el promedio ± desviación estándar (DE).

| Tratamientos | Viabilidad celular (%) | TNF-α (ng/ml) |
|---|---|---|
| Sin inductor | 98 ± 1,3 | 0,00 ± 0,000 |
| Caseinato de sodio | 91 ± 2,5* | 2,19 ± 0,297* |
| Caseína α | 94 ± 6,5 | 0,40 ± 0,064* |
| Caseína β | 96 ± 4,5 | 0,00 ± 0,000 |
| Caseína κ | 93 ± 6,3 | 0,00 ± 0,000 |

* Resultados significativamente diferentes de la línea 32D cl3 sin inductor (p<0,05) en la prueba de Dunnet

Una forma de evaluar el compromiso indicativo de un posible daño celular es la detección de la translocación de la fosfatidilserina de la cara interna a la externa de la membrana celular, lo que indica apoptosis. Los datos obtenidos de la citometría de flujo indicaron que el 23, el 16, el 10 y el 8 % de la población presentó translocación en la región de apoptosis tardía en presencia de caseinato de sodio, y de las caseínas α, β o κ, respectivamente, mientras que en el control esta proporción fue de 4 % (figura 2).

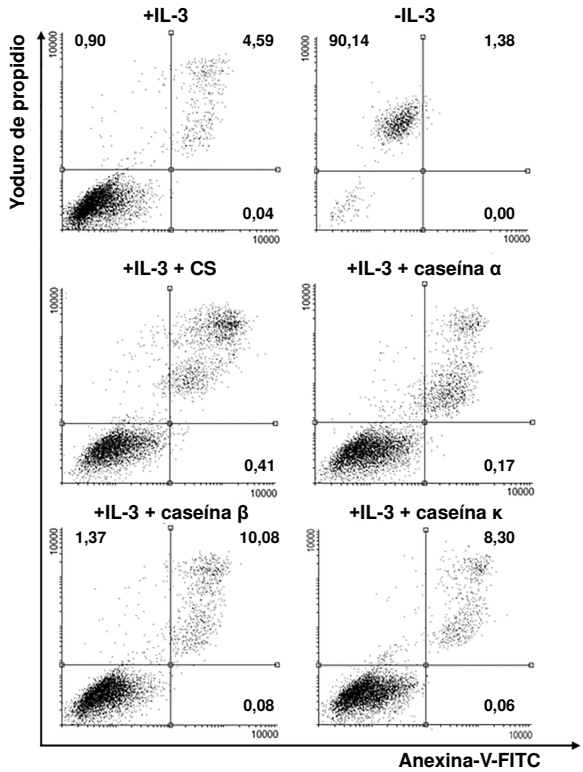


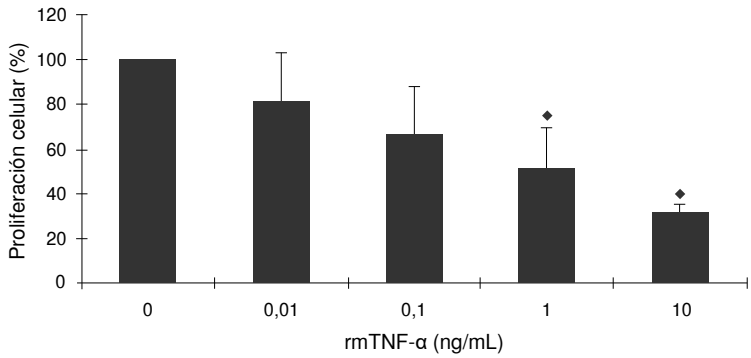

**Figura 2.** Línea celular 32D cl3 en presencia de 0,5 ng/ml de rmIL-3 incubada con 2 mg/ml de caseinato de sodio y con las caseínas α, β y κ. Se detecta apoptosis por tinción dual de anexina V y yoduro de propidio. Además, se incluye la línea celular 32D cl3 incubada sin rmIL-3 como control de la muerte celular.

### *El caseinato de sodio y la caseína β indujeron la producción de TNF-α en las células 32Dcl3.*

La inducción de la apoptosis puede ser mediada por TNF-α, por lo que al evaluar su presencia en el medio condicionado de células con tratamiento de caseinato de sodio o caseínas, o sin este, la prueba de ELISA evidenció que 2 mg/ml de caseinato de sodio y 1 mg/ml de caseína α inducían la liberación de dicho factor (cuadro 1). En este sentido, aun cuando la adición de la caseína β o la κ redujo de manera significativa la proliferación, los resultados del ELISA indicaron que no inducían la liberación del TNF-α.

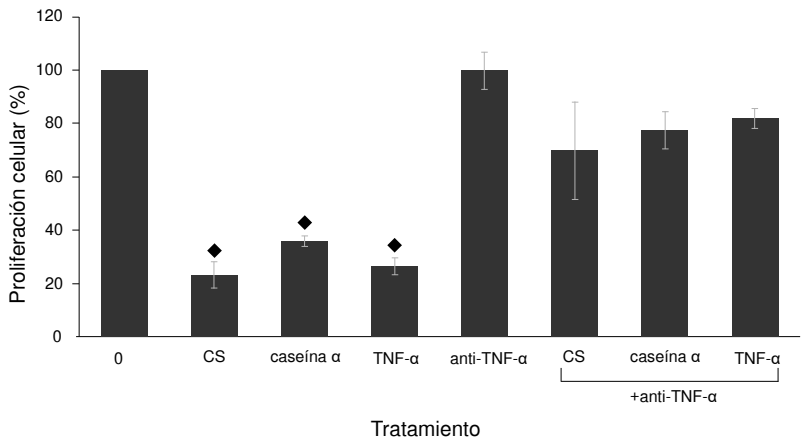
### *El TNF-α fue responsable de la inhibición de la proliferación en cultivos con caseinato de sodio y caseína β.*

Al constatar que el TNF intervenía en la inhibición de la proliferación de las células 32Dcl3, se procedió a demostrar que estas eran sensibles al efecto del TNF-α recombinante. Los resultados indicaron que sí inhibió la proliferación de 32Dcl3 según la dosis utilizada (figura 3). Una vez se evidenció que el TNF-α recombinante inhibía la proliferación de las células 32Dcl3, se procedió a avaluar si el TNF-α producido por las células 32Dcl3 tratadas con caseinato de sodio o caseína α era el responsable de inhibir la proliferación. El uso de anticuerpos anti-TNF-α de ratón en células 32Dcl3 tratadas con caseinato de sodio y caseína α previno la inhibición de la proliferación en más de 80 % en las células tratadas con caseinato de sodio y en 100 % en las células tratadas con caseína α (figura 4).




♦ Resultados significativamente diferentes (p <0,05) en la prueba de Dunnet

**Figura 3.** Proliferación de la línea celular 32D cl3 después de 48 horas de incubación en presencia de 0,5 ng/ml de rmIL-3, con o sin inductor rmTNF-α en diferentes dosis. La proliferación se muestra como el porcentaje de incorporación de timidina [3H] con respecto al testigo (0 mg/ml).




♦ Resultados significativamente diferentes (p <0,05) en la prueba de Tukey

**Figura 4.** Proliferación de la línea celular 32D cl3 después de 72 horas de incubación en presencia de 0,5 ng/ml de rmIL-3 con 2 mg/ml de caseinato de sodio y caseína α, o 10 ng/ml de rmTNF-α más 16 µg/ml de anticuerpo anti-TNF-α, o solo anti-TNF-α

## Discusión

Se ha demostrado que el caseinato de sodio y la caseína α son capaces de inhibir la proliferación en las células mieloides 32Dcl3 de ratón (12). En este trabajo se muestra que estimulan la liberación del TNF-α, el cual es el principal agente supresor de la proliferación en las células tratadas con caseinato de sodio y el responsable de la inhibición mediada por la caseína α.

En algunos estudios se ha encontrado que la caseína α induce la producción de TNF-α en líneas celulares de monocitos y macrófagos (15,17) e, incluso, en células dendríticas (18). En el presente estudio se evidenció que también lo hace en la línea celular mieloide de ratón dependiente de interleucina-3 32Dcl3, una línea hematopoyética capaz de diferenciarse en eritrocitos, granulocitos y macrófagos (15), lo cual indica que la caseína α, al igual que el caseinato de sodio, regula el funcionamiento de células del sistema inmunológico e, incluso, la generación de células hematopoyéticas.

Es claro que el caseinato de sodio y la caseína α inhiben la proliferación de células 32Dcl3 por medio de la producción de TNF-α; además, ambos inducen la producción del factor estimulador de colonias de

macrófagos en la misma línea celular (13). Esto sugiere que pueden activar mecanismos similares, a diferencia de las caseínas β y κ, las cuales inhiben la proliferación, pero no lo hacen por medio del TNF-α, por ello, sería interesante evaluar la participación de otras citocinas inhibidoras de progenitores hematopoyéticos, como el interferón α, que induce la producción de inhibidores de la progresión del ciclo celular en células troncales y progenitoras hematopoyéticas (19).

Se sabe que la caseína activa los macrófagos mediante la unión al receptor TLR4 (20) y es probable que en la línea mieloide normal de ratón dependiente de interleucina-3 32Dcl3, que es una progenitora hematopoyética (16), lo haga por medio del mismo tipo de receptores, ya que se sabe que las células troncales y progenitoras hematopoyéticas también expresan los receptores TLR4 (21).

Es interesante señalar que, siendo la subunidad de mayor representatividad entre las micelas de la caseína (20), la caseína α en asociación con el caseinato de sodio ejerza efectos similares a este en cuanto a la proliferación e, incluso, la diferenciación y la expresión de citocinas. En este sentido, dado que las caseínas presentan en su estructura péptidos bioactivos, algunos de ellos con características opioides (22,23), sería interesante determinar si alguno de estos es el responsable de la inducción del TNF-α en las células 32Dcl3 tratadas con caseína α.

Nuestros datos revelan que ni las caseínas ni el caseinato de sodio alteran la viabilidad celular detectada mediante el MTT, una prueba que evidencia la actividad metabólica mitocondrial (que solo tiene lugar en células vivas) (24), lo cual no coincide con la ligera inducción de translocación de fosfatidilserina causada por todas las caseínas, especialmente, por el caseinato de sodio (23 %) y la caseína α (16 %), justamente en las condiciones en que se observa la liberación de TNF-α, un promotor de la inducción de la apoptosis (25). La translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana es un evento temprano de inducción de la apoptosis y, por lo tanto, es reversible (26). Por ello, bajo estas condiciones es probable que la funcionalidad mitocondrial aún no se encontrara comprometida en el presente estudio (27) y que la viabilidad siguiera intacta. Sin embargo, sabiendo que el TNF-α induce necroptosis (28), sería interesante analizar si las caseínas activan esta ruta de muerte.

Por último, la línea celular 32Dcl3 se considera normal porque no es cancerígena y, habiendo demostrado que las caseínas no inducen la muerte celular en las células hematopoyéticas de médula ósea normal (12), puede decirse que se tienen los modelos para estudiar los mecanismos de eliminación de células en proceso de transformación celular y de aquellas propiamente tumorales, pero no de las verdaderamente normales, tal como lo hace la caseína.

En conclusión, las caseínas α, β y κ inhiben la proliferación de las células 32Dcl3 de manera análoga al caseinato de sodio y el rmTNF-α. El caseinato de sodio y la caseína α, pero no así las caseínas β o κ, inducen la producción de TNF-α en las células 32Dcl3, y este factor es el principal responsable de la inhibición de la proliferación en cultivos con caseína α y caseinato de sodio.

**Agradecimientos**

A Ranulfo Pedraza Garnelo† y Sandra Salazar Aguilar por el apoyo técnico brindado.

## Referencias


1. Koletzko B, Agget PJ, Bindels JG, Bung P, Ferré P, Gil A, *et al.* Growth development and differentiation: A functional food science approach. Br J Nutr. 1998;80:5-45. https://doi.org/10.1079/BJN19980104
2. Kon S. Milk and milk products in human nutrition. Second edition. Rome: FAO Nutr Stud; 1977.
3. Walstra P, Jenness R. Dairy chemistry and physics. First edition. New York, USA: Wiley and Sons, 1984.
4. Warner J. Principios de la tecnología de lácteos. 1ª edición. México: AGT; 1976.
5. Hall C. Drying of milk and products. Second edition. Conneticut, USA: The Avi Pub Company Inc.; 1971.
6. Okano M, Ohnota H, Sasaki R. Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats by reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursor cells. J Nutr. 1992;122:1376-83. https://doi.org/10.1093/jn/122.7.1376
7. Wong CW, Seow HF, Liu AH, Husband AJ, Smithers GW, Watson DL. Modulation of immune responses by bovine β-casein. Immunol Cell Biol. 1996;74:323-9. https://doi.org/10.1038/icb.1996.58
8. Tatsuta M, Lishi H, Baba M, Taniguchi H. Enhanced induction of colon carcinogenesis by azoxymethane in wistar rats fed a low-protein diet. Int J Cancer. 1992;50:108-11. https://doi.org/10.1002/ijc.2910500122
9. da Silva-Menezes J, de Sousa-Mucida D, Carmona-Cara D, Alvarez-Leite JL, Russo M, Vaz NM, *et al.* Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. Int Immunol. 2003;15:447-55. https://doi.org/10.1093/intimm/dxg043
10. Kampa M, Loukas S, Hatzoglou A, Martin P, Castanas E. Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human alpha S1 casein (alpha S1-casomorphin, and alpha S1-casomorphin amide). Biochem J. 1996;319:903-8. https://doi.org/10.1042/bj3190903
11. Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Hatzoglou C, Martin PM, Castanas E. Antiproliferative and receptor binding properties of α-and β-casomorphins in the T47D human breast cancer cell line. Eur J Pharmacol. 1996;310:217-23. https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00339-1
12. Ramos-Mandujano G, Weiss-Steider B, Melo B, Córdova Y, Ledesma-Martínez E, Bustos S, *et al.* Alpha-, beta- and kappa-caseins inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32D cl3 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties. Immunobiology. 2008;213:133-41. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.07.004
13. Ramos G, Weiss B, Córdova Y, Hernández J, Zambrano I, Santiago E. Sodium caseinate induces expression and secretion of the murine multipotent myeloid cell line 32D macrophage colony-stimulating factor. Arch Med Res. 2004;35:109-13. https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2003.11.001
14. Vordenbaumen S, Saenger T, Braukmann A, Tahan T, Bleck E, Jose J, *et al.* Human casein alpha s1 induces proinflammatory cytokine expression in monocytic cells by TLR4 signaling. Mol Nutr Food Res. 2016;60:1079-89. https://doi.org/10.1002/mnfr.201500792
15. Kharbanda S, Nakamura T, Datta R, Sherman ML, Kufe D. Induction of monocytic differentiation by tumor necrosis factor in phorbol ester-resistant KG-1a cells. Cancer Commun. 1990;2:327-32.
16. Ledesma E, Martínez L, Córdova Y, Rodríguez-Sosa M, Monroy A, Mora L, *et al.* Interleukin-1 (IL-1β) induces tumor necrosis factor alpha (TNF-α) expression on mouse myeloid multipotent cell line 32D cl3 and inhibits their proliferation. Cytokine. 2004;26:66-72. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2003.12.009
17. Weber C, Aepfelbacher M, Haag H, Ziegler-Heitbrock HW, Weber PC. Tumor necrosis factor induces enhanced responses to platelet-activating factor and differentiation in human monocytic Mono Mac 6 cells. Eur J Immunol. 1993;23:852-9. https://doi.org/10.1002/eji.1830230413
18. Daneshmandi S, Nourizadeh M, Pourpak Z, Pourfathollah AA. Eliciting Th1 immune response using casein- (Alpha S1) loaded dendritic cells. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2017;16:159-68.
19. Smith JN, Kanwar VS, MacNamara KC. Hematopoietic stem cell regulation by type I and II interferons in the pathogenesis of acquired aplastic anemia. Front Immunol. 2016;29:1-13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00330

20. Tobita K, Kawahara T, Otani H. Bovine beta-casein (1-28), a casein phosphopeptide, enhances proliferation and IL-6 expression of mouse CD19+ cells via Toll-like receptor 4. J Agric Food Chem. 2006;54:8013-7. https://doi.org/10.1021/jf0610864

21. Megías J, Yáñez A, Moriano S, O'Connor JE, Gozalbo D, Gil ML. Direct Toll-like receptor-mediated stimulation of hematopoietic stem and progenitor cells occurs *in vivo* and promotes differentiation toward macrophages. Stem Cells. 2012;30:1486-95. https://doi.org/10.1002/stem.1110

22. Otani H, Hata I. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine milk caseins and their digests. J Daily Res. 1995;62:339-48. https://doi.org/10.1017/S0022029900031034

23. Meisel H. Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk protein. Current Med Chem. 2005;12:1905-19. https://doi.org/10.2174/0929867054546618

24. Kharbanda S, Nakamura T, Datta R, Sherman ML, Kufe S. Induction of monocytic differentiation by tumor necrosis factor in phorbol ester-resistant KG-1a cells. Cancer Commun. 1990;2:327-32. https://doi.org/10.3727/095535490820874074

25. Dong QM, Ling C, Chen X, Zhao L. Inhibition of tumor necrosis factor-α enhances apoptosis induced by nuclear factor-κB inhibition in leukemia cells. Oncol Lett. 2015;10:3793-8. https://doi.org/10.3892/ol.2015.3786

26. Amarante-Mendes GP, Green DR. The regulation of apoptotic cell death. Braz J Med Biol Res. 1999;32:1053-61. https://doi.org/10.1590/S0100-879X1999000900001

27. Wang JS, Wu-D'Huang DY, Lin WW. TAK1 inhibition-induced RIP1-dependent apoptosis in murine macrophages relies on constitutive TNF-α signaling and ROS production. J Biomed Sci. 2015;22:22-76. https://doi.org/10.1186/s12929-015-0182-7

28. Morgan JE, Prola A, Mariot V, Pini V, Meng J, Hourde C, *et al*. Necroptosis mediates myofibre death in dystrophin-deficient mice. Nat Commun. 2018;9:3655. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06057-9

Biomédica 2019;39:300-13
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.3820

Artículo original

# El biomodelo porcino en la investigación médica traslacional: del biomodelo al humano en trasplante pulmonar

Liliana Fernández-Trujillo[1,2,3,4], Mauricio Velázquez[3,4,5], Luz Fernanda Sua[2,3,4,6], Indira Cujiño[3,4,7], Martha Giraldo[7], Diego Medina[8], Mauricio Burbano[6], Germán Torres[6], Carlos Muñoz-Zuluaga[2,3,4], Leidys Gutiérrez-Martínez[2,3,4]

[1] Departamento de Medicina Interna, Servicio de Neumología, Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia
[2] Centro de investigaciones Clínicas, Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia
[3] Línea de Investigación Biomédica en Tórax, Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia
[4] Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Icesi, Cali, Colombia
[5] Unidad de Cirugía de Tórax, Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia
[6] Departamento de Patología y Medicina de Laboratorio, Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia
[7] Servicio de Anestesiología, Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia
[8] Unidad de Cirugía Cardiovascular, Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia
[9] Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica, Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia

**Introducción.** La anatomía humana y porcina son comparables. En consecuencia, el biomodelo porcino tiene el potencial de ser implementado para entrenar al profesional quirúrgico en áreas como el trasplante de órganos sólidos.
**Objetivo.** Describir los procedimientos y hallazgos obtenidos mediante experimentos de medicina respiratoria traslacional con biomodelos porcinos realizados en un laboratorio de experimentación animal, y hacer una revisión comparativa entre el pulmón humano y el porcino.
**Materiales y métodos.** El experimento se llevó a cabo en nueve cerdos de raza híbrida en un laboratorio de cirugía experimental. Se estudiaron la anatomía y la histología de las vías respiratorias mediante fibrobroncoscopia, biopsia bronquial y lavado broncoalveolar. El lavado broncoalveolar se estudió con citología en base líquida y se evaluó con las coloraciones de Papanicolau y hematoxilina y eosina. Se utilizaron técnicas de patología molecular, como inmunohistoquímica, citometría de flujo y microscopía electrónica. Los cerdos se sometieron a neumonectomía izquierda con posterior implante del injerto en otro cerdo experimental.
**Resultados.** Los estudios histopatológicos y moleculares evidenciaron un predominio de macrófagos alveolares (98 %) y linfocitos T (2 %) en el lavado broncoalveolar porcino. En los estudios del parénquima pulmonar porcino se encontró tejido linfoide hiperplásico asociado a las paredes bronquiales. La microscopía electrónica evidenció linfocitos T dentro del epitelio y el diámetro de las cilias porcinas fue similar al de las humanas.
**Conclusiones.** El biomodelo porcino es viable en la investigación traslacional para el entendimiento de la anatomía del sistema respiratorio y el entrenamiento en trasplante pulmonar. La implementación de este modelo experimental podría fortalecer los grupos que planean implementar un programa institucional de trasplante pulmonar en humanos.

**Palabras clave:** trasplante de pulmón; modelos animales; histología comparada; citometría de flujo, médula ósea.

**The porcine biomodel in translational medical research: From biomodel to human lung transplantation**

**Introduction:** Human and porcine anatomy are comparable. In consequence, the porcine biomodel has the potential to be implemented in the training of surgical professionals in areas such as solid organ transplantation.
**Objective:** We described the procedures and findings obtained in the experiments of translational respiratory medicine with the porcine biomodel, within an experimentation animal laboratory, and we present a comparative review between human and porcine lung.
**Materials and methods:** The experiment was done in nine pigs of hybrid race within a laboratory of experimental surgery. The anatomy and histology of the respiratory tract were studied with fibrobronchoscopy, bronchial biopsy and bronchoalveolar lavage. The bronchoalveolar lavage was studied with liquid-based cytology and assessed with Papanicolau and hematoxylin-eosin staining. Molecular pathology techniques such as immunohistochemistry, flow cytometry, and electronic microscopy were implemented. The pigs were subjected to left pneumonectomy with posterior implantation of the graft into another experimental pig.

**Recibido:** 03/03/17
**Aceptado:** 20/09/18
**Publicado:** 24/09/18

**Citación:**
Fernández-Trujillo L, Velásquez M, Sua LF, Cujiño I, Giraldo M, Medina D, *et al.* El biomodelo porcino en la investigación médica traslacional: del biomodelo al humano en trasplante pulmonar. Biomédica. 2019;39:300-13.
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.3820

**Correspondencia:**
Liliana Fernández-Trujillo, Avenida Simón Bolívar Carrera 98 N° 18-49, torre 2, consultorio 446, Cali, Colombia
Teléfono: (52) 331 9090, extensión 7467
lfernandez@fcvl.org, lilianafernandeztrujillo@gmail.com

**Contribución de los autores:**
Liliana Fernández-Trujillo, Luz Fernanda Sua, Mauricio Velásquez, Indira Cujiño y Martha Giraldo: concepción y diseño del proyecto
Luz Fernanda Sua, Mauricio Velásquez, Indira Cujiño, Martha Giraldo, Diego Medina, Mauricio Burbano, Germán Torres y Carlos Muñoz-Zuluaga: experimentos y aporte del material para el estudio
Liliana Fernández, Luz Fernanda Sua, Leidys Gutiérrez, Mauricio Velásquez, Indira Cujiño y Carlos Muñoz-Zuluaga: redacción y revisión crítica del manuscrito
Todos los autores participaron en el análisis e interpretación de los resultados, y en la aprobación final del manuscrito.

**Financiación:**
Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Icesi y Fundación Valle del Lili

**Conflicto de intereses:**
Los autores declaran no tener conflictos de intereses para la presente publicación.

**Results:** Histopathologic and molecular studies evidenced predominance of alveolar macrophages (98%) and T-lymphocytes (2%) in the porcine bronchoalveolar lavage. Studies on the porcine lung parenchyma revealed hyperplasic lymphoid tissue associated with the bronchial walls. Electronic microscopy evidenced the presence of T-lymphocytes within the epithelium and the cilia diameter was similar to the human.
**Conclusions:** The porcine biomodel is a viable tool in translational research applied to the understanding of the respiratory system anatomy and the training in lung transplantation. The implementation of this experimental model has the potential to strength the groups who plan to implement an institutional program of lung transplantation in humans.

**Keywords:** Lung transplantation; models, animals; histology, comparative; flow cytometry; bone marrow.

Los modelos animales son fundamentales para el entendimiento de la enfermedad y en la evaluación preclínica de la seguridad y la eficacia de nuevas alternativas terapéuticas. La similitud anatómica y fisiológica entre el cerdo y el humano ha permitido emplear esta especie como un valioso modelo para la investigación biomédica traslacional (1).

En el campo de la medicina respiratoria, el biomodelo porcino ha permitido estudiar enfermedades como la fibrosis quística, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y las infecciones respiratorias (2-4). Asimismo, en estudios previos se han documentado exitosamente mecanismos inmunológicos humanos en el biomodelo porcino, lo cual aumenta su potencial como posible modelo para la investigación biomédica en trasplantes (5).

Por otro lado, el trasplante pulmonar es la única opción viable para los individuos con enfermedad pulmonar avanzada en estado terminal. En Colombia, la escasa disponibilidad de donantes óptimos y la poca frecuencia de trasplantes en humanos para el perfeccionamiento de la técnica en un equipo multidisciplinario, que involucra cirujanos, neumólogos y patólogos, limitan el uso de este procedimiento. Previamente, se han empleado biomodelos porcinos en diversos centros hospitalarios para adquirir experiencia mediante protocolos experimentales de trasplante pulmonar (6,7).

En el Laboratorio de Cirugía Experimental y Cirugía Avanzada, CICAT (Cali, Colombia), desde el 2012 se empezaron a utilizar cerdos como biomodelos experimentales de trasplante pulmonar. En el contexto nacional, la experiencia descrita es limitada. En consecuencia, en este artículo se describen los procedimientos y hallazgos obtenidos en los experimentos de trasplante pulmonar con biomodelos porcinos llevados a cabo en un laboratorio de experimentación animal. Además, se revisa la literatura científica comparativa entre el pulmón porcino y el humano.

## Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en nueve cerdos machos y hembras jóvenes de la raza híbrida *Large White* y *Landrace*, que pesaban entre 30 y 40 kg, con un ayuno de más de 12 horas, los cuales habían sido evaluados previamente por el médico veterinario.

Se sometieron a neumonectomía izquierda e implante secuencial del injerto en otro sujeto de experimentación, según el protocolo de trasplante pulmonar porcino. Se hicieron registros del comportamiento animal, la anestesia y la cirugía, la técnica, el instrumental, los tiempos, los problemas y eventos no esperados, y la variabilidad de las mediciones. Se describieron los detalles del procedimiento anestésico, la cirugía y la evaluación endoscópica con broncoscopia, así como los hallazgos histológicos, moleculares y hematológicos obtenidos en muestras de tejido pulmonar, del lavado broncoalveolar y de la médula ósea.

Los animales ingresaron al bioterio dos o tres días antes del procedimiento, permanecieron en observación y fueron evaluados constantemente por el personal veterinario. Durante este lapso de tiempo se vigiló la aparición de alteraciones del comportamiento o del estado general que pudieran contraindicar la continuación del experimento.

***Anestesia***

El protocolo de sedación del cerdo se inició con 10 mg/kg de ketamina por vía intramuscular, repitiendo la dosis cada 20 minutos según la necesidad, mientras el animal se trasladaba desde el bioterio y se instalaba en el quirófano.

Posteriormente, se canalizó la vena auricular media de la oreja, se instaló monitorización básica (electrocardiograma, oximetría de pulso y tensión arterial) más monitorización invasiva continua de la tensión arterial, y se ubicó el biomodelo sobre la mesa en decúbito prono, dado que el manejo de la vía aérea y la intubación son más fáciles en esta posición.

Se utilizó sedación sin relajación y con preoxigenación adecuada, se procedió a abrir la mandíbula mediante dos cordeles de sostenimiento, uno atado al maxilar superior y otro en la mandíbula. Después, se introdujo un laringoscopio con hoja recta y se avanzó un tubo de una luz del mayor diámetro posible (entre 7 y 7,5 mm).

Tras verificar la posición endotraqueal del tubo con capnografía, se calcularon los parámetros del respirador con una frecuencia respiratoria de 12 a 14 respiraciones por minuto, volumen corriente de 6 ml/kg y presión positiva al final de la espiración (*Positive End Expiratory Pressure*, PEEP) de 5 cm $H_2O$.

El mantenimiento anestésico se llevó a cabo con infusión continua de propofol (0,1-0,2 mg/kg/minuto), fentanilo (1-2 µg/hora) y Pavulon™ (0,1 mg/hora según necesidad).

Posteriormente, se canalizó la arteria auricular mediante disección, se midieron los gases arteriales y se corrigieron los parámetros respiratorios según el caso y las condiciones clínicas del animal.

Se administró profilaxis antibiótica según el protocolo y se recolectó sangre para autotransfusión. Los líquidos de mantenimiento durante el procedimiento quirúrgico se administraron a razón de 3 ml/kg/hora, las pérdidas por evaporación y respiración a razón de 5 ml/kg por hora y el sangrado intraoperatorio se reemplazó en una relación de 3:1 con cristaloides y de 2:1 con coloides.

***Broncoscopia***

Después de garantizar una adecuada profundidad anestésica durante el experimento, se hizo una broncoscopia flexible con un equipo Olympus™ de 4,5 mm de diámetro a través del tubo orotraqueal. Se evaluó la segmentación pulmonar y se tomaron muestras de tejido y lavado broncoalveolar con las mismas técnicas utilizadas en humanos, sin que se presentaran complicaciones (figura 1).

Las biopsias bronquiales y transbronquiales se obtuvieron mediante diferentes tipos de pinzas y, para el lavado bronquial o broncoalveolar, la técnica incluyó la aplicación de alícuotas de 10 a 20 ml de solución salina normal hasta 200 ml, que se aspiraron mediante una trampa de material (8)



**Figura 1.** Estudio de la vía aérea porcina con fibrobroncoscopia flexible y toma de muestras de lavado broncoalveolar

habiendo pasado el broncoscopio a través del tubo orotraqueal sin aspirar secreciones antes de acuñarlo distalmente, para evitar la contaminación de la muestra con secreciones altas.

El lavado bronquial permite remover células no adheridas y fluido de la superficie bronquial, mientras que el lavado broncoalveolar remueve macrófagos, células B y T, inmunoglobulinas y microorganismos presentes en el árbol traqueobronquial bajo (8).

### *Extracción de médula ósea*

Antes de iniciar el procedimiento quirúrgico, con el cerdo en sedación profunda, se tomó una muestra de la médula ósea mediante aspiración de la cresta iliaca izquierda para el análisis de citometría de flujo y los estudios comparativos con la médula ósea humana, según el estándar utilizado en humanos.

### *Técnica quirúrgica*

*Explante pulmonar.* El protocolo de cirugía se inició con la colocación del cerdo en decúbito supino. Después de una cuidadosa limpieza de la piel, se procedió con la incisión de una esternotomía media. El primer procedimiento dentro de la cavidad torácica fue la apertura de las pleuras para la inspección de los pulmones, seguida de la apertura del pericardio y la inspección y disección de la arteria pulmonar. Posteriormente, se disecó el ligamento pulmonar izquierdo, paso que puede ser difícil porque el abordaje es profundo en el espacio costodiafragmático.

Una vez el pulmón estuvo libre, se inició la disección del hilio empezando por las dos venas pulmonares, una craneal y otra caudal, las cuales se encuentran en el plano anterior más superficial del mediastino y tienen un curso extrapericárdico que favorece la disección en bloque. Estos vasos son muy frágiles en el biomodelo porcino y se lesionan fácilmente. Se continuó con la disección de la arteria pulmonar y la vena hemiácigos izquierda –que es prominente en los modelos porcinos– se disecó y se ligó. A continuación, se procedió a disecar el bronquio hasta donde fuera posible, dadas las características anatómicas del biomodelo.

Enseguida, se procedió a la infusión de la dosis de heparina, calculada según el peso del animal (3 mg/kg), y a fabricar una jareta con proleno 5-0 en la cara anterior de la arteria pulmonar, y se introdujo una cánula venosa Nº 12.

Con el fin de practicar la neumonectomía y el explante del órgano, se procedió a pinzar la aorta torácica y se inició la infusión del líquido de preservación. La solución de preservación utilizada fue perfadex™ (60 ml/kg de peso del biomodelo), con descompresión del sistema mediante una incisión en la vena cava inferior y la orejuela cardiaca izquierda. Las bolsas de la solución se ubicaron a una altura suficiente (± 50 a 60 cm por encima del tórax) para mantener una presión de perfusión de 15 a 20 mm Hg. Se anotó la hora en que se colocaron las pinzas y se controló que hubiera buena perfusión.

En este punto de la extracción comenzó el tiempo de isquemia fría, durante el cual es importante mantener la superficie pulmonar a la menor temperatura posible, por lo que a la baja temperatura de la solución de perfadex™, se añadió la instilación continua de suero frío en ambos hemitórax (a 4 ºC). Hasta ese momento se mantuvieron los pulmones ventilados con una fracción de $O_2$ inspirado ($FIO_2$) de 0,4 o lo suficiente para mantener la saturación entre 95 y 100 % y la PEEP de 3 a 5 cm de $H_2O$.

Se fabricaron los muñones de la arteria pulmonar y de las venas pulmonares, dejando una orejuela de aurícula izquierda para facilitar la anastomosis, así como el muñón bronquial. Se extrajo el pulmón y, ya fuera del campo, se comprobó el correcto estado de las estructuras. Se introdujo una cánula en las venas pulmonares para hacer la perfusión pulmonar retrógrada con solución de perfadex™ hasta que el líquido que saliera por la arteria pulmonar fuera totalmente cristalino. Se introdujo el pulmón en la bolsa de plástico estándar con el líquido de perfusión restante y se cerró herméticamente. A continuación, se introdujo en una segunda bolsa con suero frío y luego en una tercera, según la recomendación del protocolo convencional del manejo del órgano donado en trasplante pulmonar.

*Implante pulmonar.* En la cirugía de implante pulmonar en otro biomodelo porcino se siguieron los pasos de la anestesia del modelo de una forma similar al de la extracción pulmonar y, luego, se inició la monitorización invasiva, para lo cual se colocó un catéter en la arteria pulmonar mediante disección por la vía yugular externa, el cual se avanzó hasta la salida de la arteria pulmonar. Se introdujo, también, una sonda vesical Foley Nº 12 para la medición horaria de la diuresis. Al inicio, se extrajeron 200 ml de sangre total del biomodelo receptor en la bolsa de preservación para la autotransfusión, con el fin de utilizarlos en la fase de reperfusión.

Durante el proceso del implante, se aisló el pulmón izquierdo por medio de la ventilación del pulmón derecho, avanzando el tubo orotraqueal hasta el bronquio fuente derecho. Se elevó la frecuencia respiratoria a 18 respiraciones por minuto y se disminuyeron los volúmenes pulmonares a 4-5 ml/kg, manteniendo las presiones pico en la vía aérea por debajo de 25 cm de $H_2O$. Se midieron los gases arteriales a los 10 minutos de iniciada la ventilación unipulmonar y se hicieron los correctivos correspondientes.

El protocolo de la cirugía se inició colocando al cerdo en decúbito lateral derecho. Se hizo una cuidadosa limpieza de la piel, se procedió con la incisión de toracotomía postero-lateral izquierda desde el primer pezón hasta 2 cm por debajo de la punta de la escápula y luego postero-cranealmente alrededor de la escápula, 5 cm aproximadamente. La incisión en la piel fue de 17 ± 2 cm en el séptimo espacio intercostal, disecando por planos hasta llegar a la cavidad pleural.

El primer procedimiento dentro de la cavidad fue la disección del ligamento pulmonar. Se continuó con la disección del hilio, empezando por las venas pulmonares y siguiendo con la arteria pulmonar, y luego con la disección del bronquio para completar la neumonectomía y extraer el pulmón izquierdo. Después de esto, se extrajo el pulmón izquierdo de la nevera y las bolsas de preservación y se introdujo en la cavidad pleural. Se hicieron las anastomosis de aurícula izquierda y la arteria pulmonar con prolene 5-0 y, la del bronquio, con prolene 4-0. Se administró un gramo de metilprednisolona para inducir la inmunosupresión. Se acomodó el biomodelo receptor en la posición de Trendelemburg y se retiró la pinza de la aurícula para perfundir nuevamente el pulmón en sentido retrógrado, y dejar salir el aire y los restos del líquido de reperfusión a través del último punto de la sutura arterial antes de anudarla. Posteriormente, se abrió muy lentamente la arteria para evitar el aumento brusco de la presión en el lecho vascular del pulmón donante, que estaba frío y bajo los efectos de la isquemia.

Una vez se completó el proceso de implante y reperfusión del pulmón, se retiró nuevamente el tubo orotraqueal hasta la tráquea y se reanudó la insuflación de ambos pulmones, primero manualmente y, después, con el respirador, monitorizando las presiones en la vía aérea y en los pulmones, así como los parámetros gasométricos. Se vigiló constantemente la volemia y se repuso con cristaloides y la sangre para autotransfusión almacenada previamente. La monitorización hemodinámica mostró la necesidad de utilizar fenilefrina en bolos de 0,01 mg o en infusión por microgoteo cuando se presentaba hipotensión sostenida.

Se llevaron a cabo la hemostasia, el cuidado, la revisión y el lavado con suero de la cavidad pleural. Seguidamente, se colocó un tubo de tórax Nº 28, el cual se fijó con seda 0 y se cerró por planos, según lo habitual en una cirugía de tórax.

Se hizo un control broncoscópico al final de la intervención para comprobar el estado de la sutura bronquial y limpiar de secreciones el árbol bronquial. Se suministró soporte de oxígeno para garantizar saturaciones superiores al 90 %; se manejó el dolor y se controlaron el cuadro hemático, los gases arteriales cada seis horas, el volumen urinario y la producción por el tubo de tórax.

El protocolo de experimentación estipulaba el sacrificio 24 horas después del procedimiento y el explante del pulmón trasplantado para su estudio microscópico. Los biomodelos se conservaron por un periodo máximo de seis horas (9).

***Estudios de patología molecular***

El lavado broncoalveolar se estudió por citología en base líquida (*BD CytoRich*™), según el protocolo del laboratorio institucional, y se evaluó con coloraciones de Papanicolau, y de hematoxilina y eosina. La medula ósea se fijó en TransFix™ y se transportó inmediatamente al laboratorio de citometría de flujo.

Se observó la distribución celular medular según el tamaño y la granularidad (SS INT/FS INT) y se evaluó la expresión del anticuerpo CD34 en las células madre de medula ósea. Se evaluó el parénquima pulmonar con la coloración de hematoxilina y eosina.

Por último, el epitelio bronquial se estudió mediante microscopía electrónica de barrido.

### *Consideraciones éticas*

Este estudio se rigió por la Ley 84 de 1989, es decir, por el Estatuto Nacional de Protección de Animales y por la Declaración Universal de los Derechos del Animal. El protocolo de investigación fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética para la experimentación animal de la Universidad Icesi.

## Resultados

### *Lavado broncoalveolar*

Se encontró predominio de macrófagos alveolares (98 %) y linfocitos (2 %). No se encontraron neutrófilos, cristales ni microorganismos (figura 2).

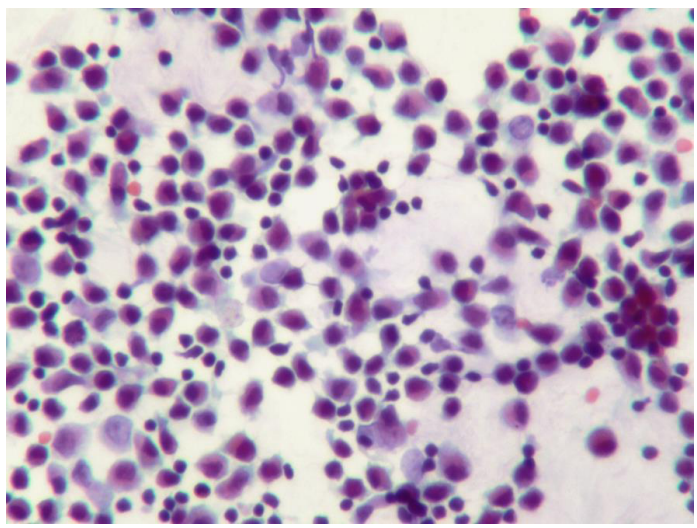


**Figura 2.** Lavado broncoalveolar con predominio (98 %) de macrófagos alveolares. Papanicolau, 40X

### *Médula ósea*

En la médula ósea y en los estudios de citometría de flujo se evidenció viabilidad adecuada y una posición similar a la humana en la gráfica de puntos (figura 3).

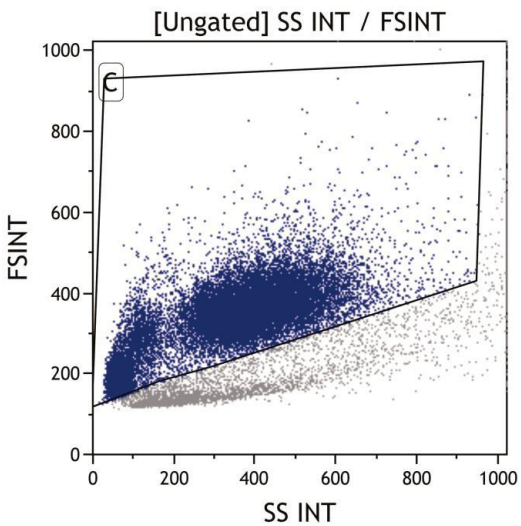



**Figura 3.** Distribución según tamaño y granularidad de la medula ósea porcina, según la citometría de flujo

### *Parénquima pulmonar*

En el cerdo se encontró un sistema de conducción, transición e intercambio, así como bronquios, bronquiolos, alvéolos, trama vascular y distribución de neumocitos de tipo 1 y de tipo 2, similares a los de los humanos. Además, se observó tejido linfoide hiperplásico asociado a las paredes bronquiales (*Bronchus-Associated Lymphoid Tissue,* BALT), el cual solo se observa en enfermedades respiratorias como la bronquiolitis folicular en los humanos (figura 4).

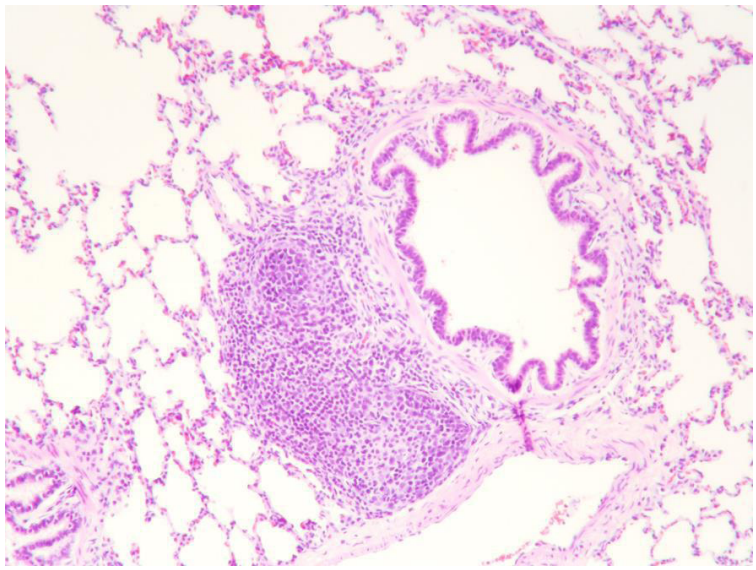


**Figura 4.** Presencia de BALT en tejido pulmonar porcino, normal en el cerdo pero no en el humano. Coloración hematoxilina-eosina. 10x

### *Inmunohistoquímica*

En cuanto a la expresión de anticuerpos, se comprobó una expresión similar a la humana de citoqueratinas en el epitelio respiratorio, entre ellas, la CKAE1/AE3. Asimismo, hubo expresión de CD3 o CD34, según el cuadro, en los linfocitos de la línea T de los cerdos, antígeno que también se expresa en el humano (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Características anatomopatológicas del biomodelo porcino de la especie híbrida *Large White* y *Landrace* y del humano

| Características anatomopatológicas | Biomodelo porcino | Humano |
|---|---|---|
| Sistema de conducción, transición e intercambio | Similar | Similar |
| Bronquio, bronquiolos, alvéolos y trama vascular | Similar | Similar |
| Distribución de neumocitos de tipo 1 y de tipo 2 | Similar | Similar |
| Tejido linfoide asociado a los bronquios (*Bronchus-Associated Lymphoid Tissue*, BALT) | Hiperplásico | No hiperplásico |
| Leucocitos | 11.000-22.000 células/µl | 5.000-10.000 células/µl |
| Cuantificación y viabilidad de las células madre por citometría de flujo | Expresión, viabilidad y posición similar de CD34 | Expresión, viabilidad y posición similar de CD34 |

### *Microscopía electrónica de barrido*

En el estudio con microscopía electrónica de barrido, se encontraron linfocitos T dentro del epitelio respiratorio y, además, cilias con un diámetro entre 12 y 14 µm, como en los humanos (figura 5).

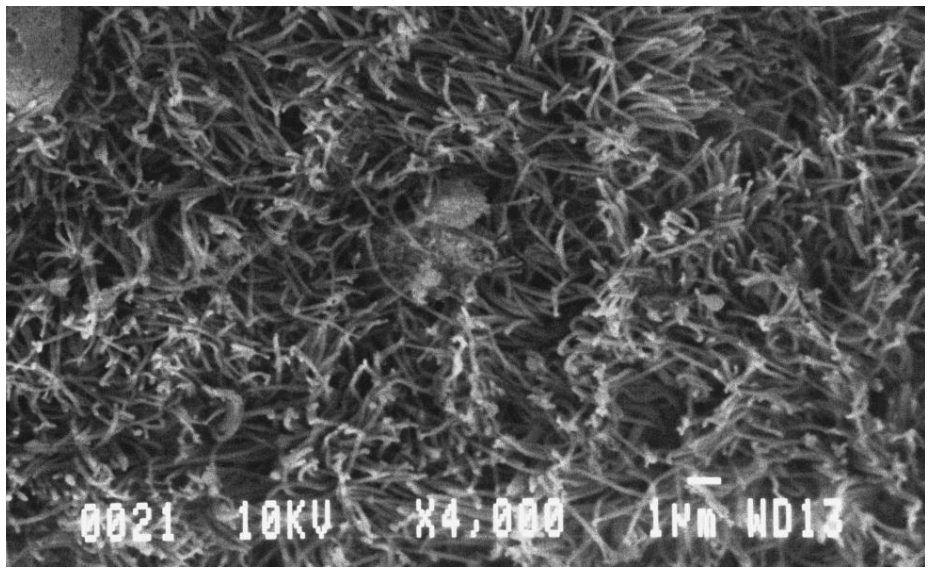



**Figura 5.** Microscopía electrónica de barrido donde se observan cilias con un diámetro de 12 a 14 µm. 4.000 X

## Discusión

En investigación biomédica traslacional, el biomodelo porcino es valioso para el estudio de enfermedades humanas de interés gracias a su similitud con el ser humano en cuanto a la anatomía, histología y algunos mecanismos fisiopatológicos (1,10).

Recientemente, la limitación para hacer comparaciones con modelos de roedores ha sido superada gracias al cerdo y los notables avances en el estudio de su genoma, así como en la generación de modelos porcinos en los cuales se pueden recrear muchas de las enfermedades genéticas del ser humano para su estudio (1). Estos logros han aumentado considerablemente la importancia del biomodelo porcino en la investigación biomédica traslacional. Como resultado de lo anterior, el cerdo se ha implementado como biomodelo para la fibrosis quística y el enfisema pulmonar, y ha sido útil en el estudio y la validación de nuevos tratamientos (2,3).

En el área del trasplante pulmonar, el cerdo ha sido el animal grande más comúnmente usado en investigación (11,12). Este biomodelo tiene el potencial de ser implementado en el aprendizaje y el reforzamiento de la técnica quirúrgica, el estudio del procedimiento anestésico, los procedimientos invasivos y el sostenimiento posoperatorio (7,9,13). Además, ofrece la posibilidad de integrar desde el contexto experimental el trabajo multidisciplinario que se exige en los trasplantes durante el entrenamiento previo al ejercicio médico real.

El trasplante pulmonar es una opción terapéutica definitiva para los pacientes con enfermedades pulmonares irreversibles y terminales (14). Además, en el contexto nacional, los estudios sobre experimentación animal con enfoque práctico son limitados. En este sentido, este estudio brinda

evidencia sobre la viabilidad de ejecutar el trasplante pulmonar en el biomodelo porcino y la posibilidad de fortalecer esta práctica a nivel institucional, así como la integración del equipo que interviene en dicho procedimiento.

Son múltiples las similitudes anatómicas e histológicas entre el sistema respiratorio porcino y el del ser humano, las cuales ofrecen importantes ventajas al momento de considerar los modelos animales de experimentación en los estudios de medicina respiratoria traslacional.

A continuación, se hace una revisión comparativa en la que se describen las similitudes anatómicas e histológicas entre el sistema respiratorio porcino y el humano, las cuales permiten considerar el biomodelo porcino como ventajoso con respecto a otros modelos animales de experimentación.

***Anatomía del pulmón porcino***

A diferencia de los bronquiolos respiratorios humanos que a menudo están conectados a dos o tres conductos alveolares primordiales en el nacimiento, los bronquiolos respiratorios porcinos neonatales están típicamente conectados con los conductos alveolares (15).

Los alvéolos porcinos se multiplican rápidamente en las primeras dos a cuatro semanas de vida, mientras que el desarrollo es similar durante los tres primeros años de la vida humana (15,16). El tamaño de los acinos porcinos perinatales (~5 mm) es más pequeño que el de los acinos del infante humano (~11 mm) (7).

La estructura y la distribución de las vías respiratorias porcinas varían morfológicamente según la edad y la raza de cerdo, pero son muy similares a las del pulmón humano. La tráquea porcina es notablemente más larga y más cartilaginosa que en los seres humanos; esta contiene 32 a 45 anillos y se divide en el bronquio fuente derecho y en el izquierdo a nivel de la quinta vértebra dorsal.

En el cerdo las vías respiratorias contienen más cartílago en su estructura, pero tienen un número similar de generaciones bronquiales: se han identificado 23 en los seres humanos y en los cerdos (15,17,18). La disminución general del diámetro y la longitud de las bifurcaciones del árbol bronquial humano también se observan en las vías respiratorias porcinas (18,19). Sin embargo, en contraste con el árbol de las vías respiratorias humanas, que tiene un patrón de ramificación bípoda, el porcino tiene un patrón de ramificación monópoda en el cual cada bronquio ‘madre’ da lugar a ramas laterales más pequeñas (bronquios) que se ramifican en ángulos obtusos (20).

Los pulmones de los cerdos y de los humanos son lobulados, con el lóbulo pulmonar bien definido y demarcado por tabiques interlobulillares. En el pulmón humano, el componente de colágeno de estos tabiques interlobulares es incompleto, y se han descrito poros interalveolares, o de Kohn, y canales de comunicación en las paredes alveolares (21,22). Estos factores pueden conducir a la ventilación colateral entre los lóbulos, especialmente en los pulmones enfisematosos. Por el contrario, el componente de colágeno de los tabiques interlobulares porcinos es más completo y la ventilación colateral es sustancialmente menos probable (23).

La anatomía bronquial y lobar de los cerdos es similar a la de los humanos. El pulmón izquierdo porcino es similar al pulmón izquierdo humano, ya que consta de un lóbulo craneal y un lóbulo caudal. El bronquio del lóbulo craneal izquierdo se divide en bronquios segmentarios craneal

y caudal. Esto es similar a la división de los bronquios del lóbulo superior izquierdo, para el lóbulo superior izquierdo y la língula, en los seres humanos. El bronquio izquierdo caudal se divide en cuatro bronquios segmentarios ventrales y cuatro dorsales, que ventilan el lóbulo caudal izquierdo.

En contraste con el pulmón derecho humano que tiene tres lóbulos, el pulmón porcino derecho se divide en cuatro lóbulos (craneal, medio, accesorio y caudal). El lóbulo craneal derecho es servido por un bronquio craneal (traqueal), el cual surge de la pared derecha de la tráquea, proximal a la bifurcación de la tráquea de manera independiente. El bronquio del lóbulo craneal se subdivide en los bronquios segmentarios craneal y caudal (24). Esta variante anatómica hace que el trasplante pulmonar derecho sea técnicamente difícil, por lo cual en nuestros biomodelos se seleccionó el pulmón izquierdo para el procedimiento.

Los bronquios traqueales son alteraciones que también se encuentran en los seres humanos y, por lo general, surgen entre los 2 y los 6 cm de la carina (25). El bronquio medio derecho porcino, que ventila el lóbulo medio derecho, surge inmediatamente caudal a la bifurcación de la tráquea en el lado ventrolateral. El bronquio derecho accesorio, que ventila el pequeño lóbulo accesorio, surge justo caudal al bronquio del lóbulo medio y tiene un recorrido ventromedial (26). El lóbulo accesorio está situado adyacente a la base del corazón y el diafragma, y rodea la porción intratorácica terminal de la vena cava caudal (26). El lóbulo caudal derecho se ventila por el bronquio caudal derecho, que se divide en cuatro bronquios segmentarios dorsales y cuatro ventrales (27).

La anatomía bronquial del cerdo se ha clasificado en sistemas bronquiolares dorsal, lateral, ventral y medial, cada uno nombrado según el orden en que los bronquiolos provienen del bronquio principal en cada lado (24). Aquí se propone un sistema similar al que se ha utilizado en ambos campos, el clínico y el de investigación, para los perros, caballos, gatos y seres humanos (28,29). Cada bronquio lobar se denomina según el lado del pulmón que se ventila y según el orden en el que se encuentra en la broncoscopia (30). Por consiguiente, el bronquio del lóbulo craneal derecho se llama RB1; el lobar medio, RB2; el accesorio del lóbulo derecho, RB3, y el caudal, RB4. En el pulmón izquierdo, el bronquio craneal y el caudal se denominan LB1 y LB2, respectivamente. Las ramas de los bronquios lobares se nombran según su orientación predominante así: dorsal [D], ventral [V], craneal [Cr], caudal [Cd] con el fin de proximal a distal en letras minúsculas [a, b, etc.] que representan bronquios subsegmentarios, por ejemplo, RB1, RB1Cr1, RB1Cr1a, etc. (30).

La arteria pulmonar se divide en rama derecha e izquierda, tiene un curso dorso-lateral acompañando el bronquio correspondiente, y se divide en concordancia con el árbol bronquial; las venas pulmonares se localizan ventromediales a las estructuras bronquiales. El sistema vascular sistémico tiene diferencias en el modelo porcino: la vena hemiácigos izquierda cursa al lado de la aorta descendente en el mediastino posterior y, después, cruza el hilio pulmonar izquierdo para drenar directamente dentro del seno coronario y el atrio derecho (7).

Existen otras similitudes morfológicas entre el pulmón porcino y el humano. Ambas especies tienen abundante pero variable cantidad de colágeno pleural visceral, lo que lleva a que las membranas pleurales sean más gruesas que en otras especies (22). El aporte vascular pleural visceral es de las arterias bronquiales en ambas especies, y los linfáticos pleurales viscerales son extensos (7).

### *Histología del pulmón porcino*

La arquitectura histológica es similar en las vías respiratorias humanas y en las porcinas. El tipo de epitelio que reviste su luz en los cerdos depende del nivel de las vías respiratorias que se analiza. Los pasajes nasales porcinos se componen de varios tipos de células epiteliales, incluidos epitelio escamoso, epitelio columnar seudoestratificado ciliado (epitelio respiratorio), epitelio sin cilios, epitelio columnar (epitelio de transición) y epitelio olfativo (31). Las líneas del epitelio respiratorio seudoestratificado de las vías respiratorias grandes y las líneas epiteliales columnares ciliadas de las vías respiratorias pequeñas de los bronquios y bronquiolos, se observan en el biomodelo porcino y en los humanos (13).

A diferencia de lo que sucede en otros animales, como los perros, en los bronquios de los cerdos se encuentra un gran número de glándulas submucosas (13). Las glándulas submucosas se asocian con la capa de músculo liso en todos los niveles bronquiales, tanto en la luz como en el cartílago. El tejido restante adyacente a las glándulas consta de cartílago y tejido conjuntivo y, probablemente, esto representa más del 80 % de la masa de la pared bronquial. La capa no cartilaginosa que recubre toda la luz bronquial es rica en glándulas submucosas. La diferenciación del epitelio bronquial porcino en células ciliadas, células caliciformes y células basales ocurre a los 80 días de gestación (32); las glándulas submucosas primordiales se observan alrededor de los 92 días de gestación y continúan desarrollándose durante el tiempo de maduración (32). Se ha identificado una disminución brusca de la concentración de las glándulas submucosas en las vías respiratorias más pequeñas, más allá de la unión bronquial-bronquiolar.

El epitelio de la vía aérea porcina tiene una permeabilidad al agua relativamente alta, y el epitelio traqueal porcino absorbe espontáneamente el líquido (33). Los cultivos primarios de tejido porcino y de los epitelios de las vías respiratorias humanas muestran un transporte de electrolitos cuantitativamente similar (34).

En conclusión, el cerdo es valioso como modelo animal para condiciones patológicas de interés, así como para estudiar la viabilidad y la plausibilidad de nuevas terapias. En este sentido, el entendimiento de la anatomía del pulmón porcino y la aproximación con protocolos establecidos de investigación facilitan el aprendizaje de los grupos que están empezando programas de trasplante pulmonar.

## Agradecimientos

A Gabriel Jaime Echeverri-Junca, coordinador del Laboratorio de Cirugía Experimental y Cirugía Avanzada del Centro para la Investigación en Cirugía Avanzada y Trasplantes de la Universidad Icesi.

## Referencias

1. Walters EM, Wolf E, Whyte JJ, Mao J, Renner S, Nagashima H, *et al*. Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model. BMC Med Genomics. 2012;5:55. https://doi.org/10.1186/1755-8794-5-55
2. Rogers CS, Abraham WM, Brogden KA, Engelhardt JF, Fisher JT, McCray PB, *et al*. The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008;295:L240-63. https://doi.org/10.1152/ajplung.90203.2008
3. Bruun CS, Jensen LK, Leifsson PS, Nielsen J, Cirera S, Jørgensen CB, *et al*. Functional characterization of a porcine emphysema model. Lung. 2013;191:669-75. https://doi.org/10.1007/s00408-013-9504-2

4. Borges JB, Costa EL, Suárez-Sipmann F, Widström C, Larsson A, Amato M, *et al.* Early inflammation mainly affects normally and poorly aerated lung in experimental ventilator-induced lung injury. Crit Care Med. 2014;42:e279-87. https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000161

5. Kita YF, Ando A, Tanaka K, Suzuki S, Ozaki Y, Uenishi H, *et al.* Application of high-resolution, massively parallel pyrosequencing for estimation of haplotypes and gene expression levels of swine leukocyte antigen (SLA) class I genes. Immunogenetics. 2012;64:187-99. https://doi.org/10.1007/s00251-011-0572-2

6. Snell GI, Paraskeva M, Westall GP. Donor selection and management. Semin Respir Crit Care Med. 2013;34:361-70. https://doi.org/10.1055/s-0033-1348464

7. Karimi A, Cobb JA, Staples ED, Baz MA, Beaver TM. Technical pearls for swine lung transplantation. J Surg Res. 2011;171:e107-11. https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.05.067

8. Collins AM, Rylance J, Wootton DG, Wright AD, Wright AK, Fullerton DG, *et al.* Bronchoalveolar lavage (BAL) for research; obtaining adequate sample yield. J Vis Exp. 2014. https://doi.org/10.3791/4345

9. Bufalari A, De Monte V, Pecoriello R, Donati L, Ceccarelli S, Cagini L, *et al.* Experimental left pneumonectomy in pigs: Procedure and management. J Surg Res. 2015;198:208-16. https://doi.org/10.1016/j.jss.2015.05.045

10. Lama VN, Belperio JA, Christie JD, El-Chemaly S, Fishbein MC, Gelman AE, *et al.* Models of lung transplant research: A consensus statement from the National Heart, Lung, and Blood Institute workshop. JCI Insight. 2017;2:1-14. https://doi.org/10.1172/jci.insight.93121

11. Cypel M, Liu M, Rubacha M, Yeung JC, Hirayama S, Anraku M, *et al.* Functional repair of human donor lungs by IL-10 gene therapy. Sci Transl Med. 2009;1:1-9. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000266

12. Daggett CW, Yeatman M, Lodge AJ, Chen EP, Linn SS, Gullotto C, *et al.* Total respiratory support from swine lungs in primate recipients. J Thorac Cardiovasc Surg. 1998;115:19-27. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5223(98)70438-6

13. Hartmann JF, Hutchison CF, Jewell ME. Pig bronchial mucous membrane: A model system for assessing respiratory mucus release *in vitro*. Exp Lung Res. 1984;6:59-70.

14. Hartert M, Senbaklavacin O, Gohrbandt B, Fischer BM, Buhl R, Vahld CF. Lung transplantation: A treatment option in end-stage lung disease. Dtsch Arztebl Int. 2014;111:107-16. https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0107

15. Haworth SG, Hislop AA. Adaptation of the pulmonary circulation to extra-uterine life in the pig and its relevance to the human infant. Cardiovasc Res. 1981;15:108-19.

16. Davies G, Reid L. Growth of the alveoli and pulmonary arteries in childhood. Thorax. 1970;25:669-81. https://doi.org/10.1136/thx.25.6.669

17. Florens M, Sapoval B, Filoche M. An anatomical and functional model of the human tracheobronchial tree. J Appl Physiol (1985). 2011;110:756-63. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00984.2010

18. Maina JN, van Gils P. Morphometric characterization of the airway and vascular systems of the lung of the domestic pig, *Sus scrofa*: comparison of the airway, arterial and venous systems. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2001;130:781-98. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00411-1

19. Cohen BS, Sussman RG, Lippmann M. Factors affecting distribution of airflow in a human tracheobronchial cast. Respir Physiol. 1993;93:261-78.

20. Noble PB, McLaughlin RA, West AR, Becker S, Armstrong JJ, McFawn PK, *et al.* Distribution of airway narrowing responses across generations and at branching points, assessed *in vitro* by anatomical optical coherence tomography. Respir Res. 2010;11:9. https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-9

21. Menkes HA, Macklem PT. Collateral Flow. Suppl 12. Handbook of Physiology, The Respiratory System, Mechanics of Breathing. 2011. Wiley Online Library. p. 337-53. https://doi.org/10.1002/cphy.cp030321

22. Peake JL, Pinkerton KE. Gross and subgross anatomy of lungs, pleura, connective tissue septa, distal airways, and structural units A2. In: Parent RA, Elsevier Inc. Comparative biology of the normal lung. Second edition. San Diego: Academic Press; 2015. p. 21-31. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404577-4.00003-5

23. Woolcock AJ, Macklem PT. Mechanical factors influencing collateral ventilation in human, dog, and pig lungs. J Appl Physiol. 1971;30:99-115. https://doi.org/10.1152/jappl.1971.30.1.99
24. Nakakuki S. Bronchial tree, lobular division and blood vessels of the pig lung. J Vet Med Sci. 1994;56:685-9.
25. Siegel MJ, Shackelford GD, Francis RS, McAlister WH. Tracheal bronchus. Radiology. 1979;130:353-5. https://doi.org/10.1148/130.2.353
26. Dondelinger RF, Ghysels MP, Brisbois D, Donkers E, Snaps FR, Saunders J, *et al*. Relevant radiological anatomy of the pig as a training model in interventional radiology. Eur Radiol. 1998;8:1254-73. https://doi.org/10.1007/s003300050545
27. Schummer A, Nickel R, Sack WO. The viscera of the domestic mammals. Berlín: Springer-Verlag; 1979. p. 211- 279.
28. Amis TC, McKiernan BC. Systematic identification of endobronchial anatomy during bronchoscopy in the dog. Am J Vet Res. 1986;47:2649-57.
29. Boyden EA. Segmental anatomy of the lungs: A study of the patterns of the segmental bronchi and related pulmonary vessels. New York and London: McGraw-Hill; 1955. p. 108.
30. Judge EP, Hughes JM, Egan JJ, Maguire M, Molloy EL, O'Dea S. Anatomy and bronchoscopy of the porcine lung. A model for translational respiratory medicine. Am J Respir Cell Mol Biol. 2014;51:334-43. https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0453TR
31. Jones TC, Hunt RD, King NW. Veterinary pathology. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 1997. 1392 p.
32. Baskerville A. Histological and ultrastructural observations on the development of the lung of the fetal pig. Acta Anat (Basel). 1976;95:218-33.
33. Crews A, Taylor AE, Ballard ST. Liquid transport properties of porcine tracheal epithelium. J Appl Physiol. 2001;91:797-802.
34. Liu X, Luo M, Zhang L, Ding W, Yan Z, Engelhardt JF. Bioelectric properties of chloride channels in human, pig, ferret, and mouse airway epithelia. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007;36:313-23. https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0286OC

Biomédica 2019;39:314-22
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.3837

Artículo original

# Experiencia de un centro colombiano en el tratamiento endovascular de la hemorragia posparto que amenaza la vida

María Fernanda Escobar[1], Jorge Guillermo Velásquez[2], Alejandra Holguín[3], Joselín Sánchez[3], Adriana Messa[1], Javier Andrés Carvajal[1], Albaro José Nieto[1]

[1] Departamento de Ginecología y Obstetricia, Unidad de Alta Complejidad Obstétrica, Fundación Clínica Valle del Lili, Cali, Colombia
[2] Departamento de Cardiología Invasiva, Servicio de Hemodinamia, Fundación Clínica Valle del Lili, Cali, Colombia
[3] Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad Icesi, Cali, Colombia

**Introducción.** La hemorragia posparto es la primera causa de morbimortalidad materna en el mundo y las laceraciones son la segunda causa en frecuencia. Su tratamiento temprano y apropiado es clave para obtener buenos resultados, y la oclusión endovascular de los vasos pélvicos se cuenta entre las opciones terapéuticas.
**Objetivo.** Describir la experiencia del tratamiento con la 'embolización' (sic) arterial de los vasos pélvicos.
**Materiales y métodos.** Se trató de un estudio retrospectivo del tipo de serie de casos basado en el registro institucional de la Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia, en el que se incluyeron las pacientes con hemorragia posparto atendidas entre el 1º de enero del 2011 y el 31 de octubre del 2016.
**Resultados.** De las 430 pacientes con diagnóstico de hemorragia posparto, 11 fueron sometidas a la 'embolización' de los vasos pélvicos. De este grupo, 10 pacientes tuvieron parto vaginal con laceraciones vaginales complejas, y la mayoría (9 casos, 82 %) fue remitida por otras instituciones de menor complejidad después de 20,5 horas. Las arterias ocluidas frecuentemente fueron la vaginal superior y la pudenda interna. Ninguna paciente presentó complicaciones asociadas al procedimiento y solo dos presentaron sangrado recurrente. Tres pacientes requirieron histerectomía y ninguna murió.
**Conclusión.** El manejo percutáneo es un método de tercera línea, seguro y efectivo para el control de los sangrados de difícil manejo en las pacientes con hemorragia posparto por desgarros perineales complejos. Estos resultados son similares a los reportados en la literatura científica mundial disponible hasta la fecha.

**Palabras clave:** hemorragia posparto; procedimientos endovasculares; 'embolización' terapéutica.

**Experience of a Colombian center in the endovascular management of life-threatening postpartum hemorrhage**

**Introduction:** Postpartum hemorrhage is a world-leading cause of morbidity and mortality. Lacerations are the second most frequent cause. Early management with appropriate treatment is essential to obtain adequate outcomes; the endovascular occlusion of pelvic vessels is among the management options.
**Objective:** To describe the management experience with the arterial embolization of pelvic vessels.
**Materials and methods:** We conducted a retrospective case series study based on the institutional registry of *Fundación Valle del Lili* (Cali, Colombia), which included patients with postpartum hemorrhage admitted between January 1st, 2011 and October 31st, 2016.
**Results:** Out of 430 patients diagnosed with PPH, 11 were subject to embolization of pelvic vessels. Within our group, 10 patients had a vaginal delivery with severe vaginal lacerations; most of them (9 cases, 82%) were referred from other lower-complexity institutions after 20.5 hours. Occlusion was more frequent in the superior vaginal and the internal pudendal arteries. No patients showed complications associated with the procedure and only 2 showed recurrent bleeding while 3 required a hysterectomy, but no deaths occurred.
**Conclusion:** Percutaneous management is a safe and effective third-line method for difficult-management bleedings control in patients with postpartum hemorrhage after a severe perineal tear. These results are similar to case reports published in the worldwide literature available to date.

**Keywords:** Postpartum hemorrhage; endovascular procedures; embolization, therapeutic.

**Recibido:** 09/03/17
**Aceptado:** 20/09/18
**Publicado:** 24/09/18

**Citación:**
Escobar MF, Velásquez JG, Holguín A, Sánchez J, Messa A, Carvajal JA, *et al.* Experiencia de un centro colombiano en manejo endovascular de la hemorragia postparto que amenaza la vida. Biomédica. 2019;39:314-22.
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.3837

**Correspondencia:**
Albaro José Nieto, Avenida Simón Bolívar, Carrera 98 N° 18-49, Cali, Colombia
Teléfono: (572) 331 9090, extensiones 3056 y 8705
albarojosenieto@yahoo.com

**Contribución de los autores:**
Albaro José Nieto y María Fernanda Escobar: concepción y diseño, interpretación y análisis de los datos
Joselín Sánchez y Alejandra Holguín: recolección de datos y redacción del manuscrito
Jorge Guillermo Velásquez, Javier Andrés Carvajal, Adriana Messa: concepción y diseño del estudio, adquisición, interpretación y análisis de los datos, y redacción del manuscrito

**Financiación:**
Este trabajo fue financiado por el centro de investigaciones de la Fundación Clínica Valle de Lili.

**Conflicto de intereses:**
Los autores no declaran ningún conflicto de intereses.

La mortalidad materna es un indicador de justicia social y calidad de la atención en salud. La muerte de la madre durante el embarazo, el parto o el puerperio es una tragedia que afecta las posibilidades de supervivencia del recién nacido y el futuro de los otros hijos. Cada año, aproximadamente 14 millones de mujeres sufren de hemorragia posparto y, de ellas, unas 125.000 fallecen por falta de tratamiento oportuno y adecuado (1). Después de la atonía uterina, las laceraciones del canal del parto son la principal (20 %) causa de hemorragia después del parto (2).

La elección de la modalidad terapéutica depende de la etiología, y su aplicación organizada y protocolizada es la intención de las diferentes guías de manejo (3-5). Entre las opciones de tratamiento está la obliteración del flujo sanguíneo a los órganos pélvicos (útero o vagina) mediante la ligadura de los vasos específicos o la oclusión endovascular; este último procedimiento mediante guía angiográfica fue descrito hace más de 40 años (6) y, desde entonces, demostró seguridad y eficacia en casos seleccionados (7,8). A pesar de la evidencia creciente de su efectividad (7) y de la mayor disponibilidad de salas de hemodinamia en las ciudades intermedias, el reporte de su uso en Latinoamérica es escaso (9-11).

En este trabajo, se describe la experiencia del manejo intervencionista percutáneo de la hemorragia posparto en un hospital de alta complejidad del suroccidente colombiano, con énfasis en su aplicación en mujeres con desgarros del canal del parto como su causa.

## Materiales y métodos

Se trató de un estudio de corte transversal, retrospectivo y del tipo de serie de casos, basado en el registro institucional de las pacientes atendidas en la Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia, entre el 1º de enero del 2011 y el 31 de octubre del 2016, que tuvieron diagnóstico de hemorragia posparto y fueron sometidas a una intervención vascular percutánea.

En el protocolo institucional del manejo de la hemorragia posparto, la oclusión endovascular de los vasos pélvicos se usa en mujeres con laceraciones del canal del parto que no sean rápida y eficazmente controladas mediante sutura, o cuando los hematomas retroperitoneales no pueden ser controlados durante la cirugía.

### *Método de intervención vascular percutáneo*

Bajo anestesia local y por punción femoral unilateral, se practica un aortograma abdominal con un catéter Pigtail 5 FTM™ (Cordis, Tipperary, Irlanda) e inyecciones selectivas en las arterias iliacas. En las ramas anterior y posterior de las arterias iliacas internas, se introduce de manera secuencial un catéter Cobra 2 4FRTM™ (Terumo Corporation, Shibuya-ku, Japón) y se obtienen angiogramas selectivos hasta identificar el vaso fuente del sangrado. Se avanza la guía hidrofílica Aquatrak™ (Cordis, Amstenrade, Holanda) hasta la arteria fuente del sangrado, y se procede a producir la embolia con torpedos de Gelfoam™ (Baxter, Hayward, Estados Unidos) o con espirales (TornadoTM embolization coil. Cook Medical, Bjaeverskov, Dinamarca) de entre 1 y 3 mm.

Por último, se retira el introductor femoral y se ejerce presión continua sobre la arteria durante 10 minutos, y la paciente se traslada a la unidad de cuidados intensivos obstétricos.

## Resultados

En el periodo de estudio se encontraron 430 pacientes con diagnóstico de hemorragia posparto, de las cuales 11 fueron sometidas a 'embolización' de los vasos pélvicos. La mayoría (8 de los 11 casos) eran nulíparas, con una mediana de edad de 23,2 años, todas con embarazos a término. Solo cinco asistieron a control prenatal. Diez mujeres tuvieron parto vaginal y, en todas ellas, la causa de la hemorragia fue la laceración del canal del parto y, en un caso, apareció un hematoma pélvico después de la cesárea (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Características clínicas de las pacientes con hemorragia posparto

| Paciente | Edad (años) | Gravidez | Parto | Comorbilidades | Causa | Remisión |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 19 | G1P0 | PV | Hepatitis autoinmunitaria | DV de grado II y HV | No |
| 2 | 20 | G2P1 | PV | - | DV de grado IV y HV | Sí |
| 3 | 19 | G1P0 | PV | - | DV de grado IV, hematoma retroperitoneal e histerectomía (extrainstitucional) | Sí |
| 4 | 34 | G2P1 | PV | - | DV de grado II, DC y HV | Sí |
| 5 | 31 | G2A1 | CX | Preeclampsia grave más placenta *accreta* | Hemoperitoneo y hematoma del ligamento ancho | No |
| 6 | 17 | G1P0 | PV | Preeclampsia grave | Estallido vaginal, avulsión vaginal y hematoma perineal | Sí |
| 7 | 15 | G1P0 | PV | Preeclampsia grave | Estallido vaginal | Sí |
| 8 | 31 | G2P1 | PV | Preeclampsia no grave | DV de grado IV | Sí |
| 9 | 24 | G1P0 | PV | - | Estallido vaginal | Sí |
| 10 | 28 | G1P0 | PV | - | DV de grado IV | Sí |
| 11 | 18 | G1P0 | PV | Preeclampsia grave | DV de grado II y HV | Sí |

G: gravidez; P: partos; A: abortos; PV: parto vaginal; CX: cesárea; DV: desgarro vaginal; DC: desgarro del cuello uterino; HV: hematoma vaginal

La mayoría (9 casos, 82 %) fue remitida por otras instituciones de menor nivel (cuadro 1), con una mediana de tiempo de remisión de 20,5 (rango: 9,5-26) horas después del parto, mientras que el tiempo transcurrido entre el ingreso o el nacimiento (cuando este ocurrió en la institución) y la 'embolización', fue de 5 (rango: 2 a 9) horas.

Todas requirieron transfusión de hemocomponentes: 5,3 ± 2,9 unidades de glóbulos rojos, 6 ± 3,8 unidades de plasma fresco congelado, 6 (rango: 0 a 19) unidades de crioprecipitado y 6 (rango: 6 a 12) unidades de plaquetas.

Las arterias ocluidas fueron la vaginal superior (n=5), la pudenda interna (n=1), la hipogástrica (n=2), la vulvar (n=2) y la glútea superior (n=1). Los dispositivos oclusivos utilizados fueron torpedos de Gelfoam™ (único método en cinco casos) y espirales (*coils*) (único método en tres casos); en tres pacientes se requirieron ambos métodos.

Ninguna paciente presentó complicaciones asociadas con el procedimiento y todas fueron sometidas a intervenciones adicionales para reparar los daños anatómicos. Solo en dos de ellas el sangrado no pudo ser controlado con el tratamiento endovascular (cuadro 2): una con hipotonía uterina asociada que fue la indicación para la histerectomía, y otra con un hematoma vaginal gigante que también requirió histerectomía y taponamiento pélvico y vaginal como parte del tratamiento.

**Cuadro 2.** Características del tratamiento endovascular de la hemorragia posparto

| Paciente | Remisión (horas) | Atención (horas) | Hemoderivados (unidades) | Arterias | Dispositivos | Otros procedimientos | Éxito |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | SD | 9 | 2 de GR | Ramas de la pudenda derecha | Torpedos de Gelfoam | Empaquetamiento vaginal posterior al drenaje | Sí |
| 2 | 19 | 1 | 2 de GR | Vaginales superiores bilaterales | Torpedos de Gelfoam | Taponamiento vaginal previo | Sí |
| 3 | 26 | 5 | 10 de GR, 11 de PFC, 19 de C, 18 de P | Vaginales superiores bilaterales | Torpedos de Gelfoam | Histerectomía posterior por persistencia de atonía uterina | No |
| 4 | 22 | 2 | 5 de GR, 4 de PFC, 6 de P | Vulvar derecha | Torpedos de Gelfoam | Empaquetamiento vaginal posterior al drenaje | Sí |
| 5 | 96 | 25 | 8 de GR, 9 de PFC, 6 de P | Hipogástricas bilaterales | Torpedos de Gelfomas más espirales | Histerectomía previa | Sí |
| 6 | SD | 3 | 4 de GR | Vaginales superiores bilaterales | Torpedos de Gelfoam | Reconstrucción y empaquetamiento vaginal posteriores | Sí |
| 7 | 26 | 5 | 8 de GR | Ramas vaginales bilaterales | Torpedos de Gelfoam más espirales | Reconstrucción y empaquetamiento vaginal posteriores | Sí |
| 8 | SD | 28 | 4 de GR | Vulvar derecha | Torpedos de Gelfoam más espirales | Sutura hemostática previa más reconstrucción y empaquetamiento vaginal posteriores | Sí |
| 9 | 17 | 1 | 7 de GR, 4 de PFC, 6 de C, 6 de P | Hipogástrica derecha | Espirales | Dos revisiones de cavidad para suturar desgarros con empaquetamiento vaginal previo más histerectomía posterior por hematoma vaginal más empaquetamiento abdominal más reconstrucción vaginal | No |
| 10 | 6 | 9 | 3 de GR | Glútea inferior derecha | Espirales | Empaquetamiento vaginal posterior al drenaje | Sí |
| 11 | 7 | 2 | 7 de GR, 2 de PFC, 6 de P | Vaginal izquierda | Espirales | Empaquetamiento vaginal posterior al drenaje | Sí |
| Me (RIC) | 20,5 (9,5-26) | 5 (2-9) | | | | | |

Remisión: tiempo posparto; Atención: tiempo desde ingreso o parto en la Fundación Clínica Valle de Lili; SD: sin dato; GR: glóbulos rojos; PFC: plasma fresco congelado; P: plaquetas; C: crioprecipitado; Me (RIC): mediana (rango intercuartílico)

La población de estudio presentaba grave compromiso sistémico, reflejado por la acidosis metabólica con exceso de base de -7,7, lactato sérico mayor de 2 mmol/L y hemoglobina de 7 g/dl (cuadro 3).

Una paciente presentó sepsis secundaria a la endometritis, otra, falla renal con necesidad de diálisis, y tres, coagulopatía. Tres pacientes requirieron histerectomía; a una de ellas se le practicó antes de la 'embolización', y las otras dos presentaron atonía uterina y sangrado incontrolable por hematoma del sitio operatorio. Ninguna paciente falleció.

## Discusión

La mortalidad materna en el mundo se ha reducido en 44 % en los últimos 25 años. Sin embargo, el 99 % de estas muertes se presenta en los países en desarrollo, las zonas rurales y las comunidades muy pobres, donde el

**Cuadro 3.** Características del tratamiento endovascular de la hemorragia posparto

| Caso | Ingreso | | | | Antes de la generación de la embolia | | | | | 24 horas después de la embolia | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | BE | AL (mmol/L) | ICH | HB (g/dl) | PT | PTT | INR | FBN | TBG | BE | AL (mmol/L) | ICH | HB (g/dl) |
| 1 | -6,1 | 1,2 | 0,63 | 10,8 | 9,8 | 32,1 | 0,95 | No | No | -5,3 | SD | 0,85 | 11,7 |
| 2 | -4,8 | 2,8 | 1,05 | 8 | 14,1 | 33,7 | 1,05 | No | No | -2 | 0,5 | 0,61 | 8,4 |
| 3 | -10 | 4,2 | 1,42 | 4,2 | 19,9 | 47,3 | 1,42 | 235 | Sí (A) | -6,3 | 1,4 | 1,09 | 10,4 |
| 4 | -9,2 | 3,53 | 1,12 | 5 | 11,2 | 34 | 1,08 | No | No | -4,6 | 0,83 | 0,73 | 6,5 |
| 5 | -8,3 | 1,26 | 1,37 | 3,9 | 15,9 | 36,2 | 1,15 | 255 | Sí (NA) | -4,3 | 1,06 | 0,80 | 11,1 |
| 6 | -4,7 | 1,19 | 0,81 | 9,6 | 13,3 | 34,2 | 0,95 | No | Sí (NA) | -1,2 | 0,71 | 0,61 | 8,4 |
| 7 | -8,1 | 2,03 | 0,71 | 6 | 14 | 33,8 | 1,03 | 387 | No | -4,8 | 1,11 | 0,75 | 9 |
| 8 | -9,2 | 2,28 | 1,34 | 7 | 15,8 | 38,2 | 1,12 | 476 | Sí (A) | -2,7 | 1,10 | 1,10 | 7,7 |
| 9 | -7,3 | 2,69 | 1,08 | 4,6 | 15,2 | 33,8 | 1,1 | 222 | Sí (NA) | -5,9 | 1,10 | 0,80 | 9,8 |
| 10 | -6,2 | 2,5 | 0,90 | 12,4 | 14,1 | 30,4 | 1,02 | 325 | No | SD | 1,18 | 0,64 | 8,6 |
| 11 | SD | SD | 0,81 | 11 | 15,1 | 33,5 | 1,09 | 323 | Sí (NA) | SD | SD | 0,86 | 10,7 |
| Me (RIC) | -7,7 (-9,2 /-5,7) | 2,3 (1,2-2,9) | 1,0 (0,8-1,3) | 7 (4,6-10,8) | | | | | | -4,6 (-5,6/-2,3) | 1,1 (0,7-1,1) | 0,8 (0,6-0,8) | 9 (8,4-10,7) |

BE: exceso de base; AL: ácido láctico; ICH: índice de choque; HB: hemoglobina; PT: tiempo de protrombina; PTT: tiempo parcial de tromboplastina; INR: *International Normalized Ratio*; FBN: fibrinógeno; TBG: tromboelastograma; A: alterado; NA: no alterado; SD: sin dato; Me (RIC): mediana (rango intercuartílico)

grupo etario más vulnerable son las adolescentes (1). Un patrón similar se presenta en Colombia, donde la mayoría de las muertes maternas se registran en el quintil de la población más pobre, lo cual refleja la inequidad en el acceso a los servicios de salud (12).

Algunas de las estrategias de manejo de la hemorragia posparto requieren recursos especializados no disponibles en todas las localidades, donde los sistemas de remisión oportunos son fundamentales para mejorar los resultados (12). En los últimos 30 años las técnicas endovasculares para el diagnóstico y el tratamiento de la hemorragia posparto se han desarrollado para preservar la fertilidad con menor morbilidad. Las terapias híbridas –técnicas quirúrgicas y manejo percutáneo– son útiles y seguras para las complicaciones vasculares periparto y, en algunos casos, el pilar del tratamiento (13).

La mayoría de las pacientes en este estudio correspondía a jóvenes inscritas en el régimen subsidiado del sistema de seguridad social (7 casos, 64 %) y sin educación superior (8 casos, 73 %). Solo cinco asistieron a control prenatal y la mayoria (82 %) fue remitida desde un nivel de complejidad menor; la remisión tardía, con una mediana de 20 horas entre el nacimiento y el arribo a nuestra institución, fue una constante (cuadro 1).

Las publicaciones latinoamericanas sobre la oclusión endovascular de los vasos pélvicos en la hemorragia posparto son escasas (9-11) y reportan un número reducido de pacientes, sin que se hubiera encontrado, hasta la fecha, otro reporte de hospitales colombianos. La mayoría de las series incluyen casos con diversa etiología, lo cual hace difícil la interpretación de sus resultados, y muy pocas publicaciones analizan exclusivamente los desgarros del canal del parto; sobresale la serie coreana de Cheong, *et al*. (14), que incluye 25 mujeres con hemorragia posparto secundaria a laceraciones del canal del parto entre sus 117 pacientes.

Los casos reportados en la presente serie corresponden a una población homogénea de mujeres en las que la sutura inicial de los desgarros vaginales no

fue suficiente para controlar el sangrado dadas las características de la laceración o por la dificultad para lograr hemostasia con la sutura vaginal. En todos los casos se utilizó también el taponamiento vaginal con compresas (utilizando un guante con 2 o 3 compresas en su interior para evitar el trauma de la mucosa vaginal con el tejido de la compresa) y la reparación quirúrgica bajo anestesia general para reconstruir el defecto, antes o después de la 'embolización'.

La gravedad clínica fue evidente por el promedio de la hemoglobina de ingreso (7 g/dl), el choque hipovolémico (2,3 mmol/L de lactato) y la acidosis metabólica (exceso de base de -7,7). Llama la atención la normalidad del índice de choque, situación que podría relacionarse con los volúmenes de cristaloides administrados en el sitio de atención primaria y el tratamiento recibido durante el prolongado periodo de remisión. Además, la concentración sérica de fibrinógeno al ingreso, aunque no se midió en todas las pacientes, nunca fue inferior a 200 mg/dl. Este resultado no se relaciona con la gravedad de este grupo de mujeres (15) y podría explicarse por la transfusión de crioprecipitados en algunas de ellas antes del ingreso a nuestra institución.

La técnica angiográfica utilizada fue la de Brown (6) y los dispositivos empleados para la oclusion fueron torpedos de GelfoamTM (5 casos, 46 %), espirales (3 casos, 27 %) o ambos (3 casos, 27 %) (cuadro 2). No se presentaron complicaciones derivadas de la intervención. Se han descrito fístulas vaginales (16), perforación de la arteria iliaca e isquemia del pie (17), e isquemia del plexo lumbar y del nervio ciático (14,18,19). Las complicaciones más frecuentes reportadas son las de naturaleza infecciosa o isquémica de la vejiga y el útero (20-24), en especial, al ocluir múltiples vasos (9,23).

La mayoría (10 casos, 91 %) de los vasos pélvicos comprometidos correspondió a ramas de la división anterior de la arteria iliaca interna. Sin embargo, una de las pacientes presentaba sangrado de la arteria pudenda, lo cual evidencia la importancia de explorar las dos divisiones de la arteria hipogástrica para evitar pasar por alto lesiones importantes cuando solo se examina la división anterior (25).

En algunas publicaciones se recomienda la 'embolización' para evitar la persistencia del sangrado debido a la nueva irrigación por arterias colaterales (10). Sin embargo, siguiendo este planteamiento, sería necesario generar la embolia en múltiples vasos por la compleja red de anastomosis arteriales de la vagina, el cuello uterino y el útero (26), lo cual aumenta el riesgo de complicaciones y el tiempo requerido para el procedimiento. Por otro lado, se ha reportado éxito con la oclusión unilateral selectiva cuando se identifica el sitio de fuga del medio de contraste (27,28).

Solo en cinco pacientes de esta serie fue necesaria la oclusión arterial bilateral de las ramas distales de la arteria iliaca interna en su división anterior y, en un caso, se ocluyeron ambas arterias hipogástricas. Esta última paciente tenía placenta previa y le practicaron histerectomía en el sitio de atención primaria; presentó coagulopatía clínica y sangrado masivo. Ingresó con hemoglobina de 3,9 g/dl a nuestra institución, se encontró un gran hematoma del ligamento ancho y fue imposible identificar un solo vaso terminal sangrante.

El protocolo de manejo de la hemorragia posparto secundaria a la hipotonía uterina en nuestra institución no incluye la oclusión de las arterias uterinas. En esta serie, ninguna paciente fue sometida a este procedimiento. La ausencia de oclusión bilateral rutinaria y el esfuerzo por identificar el vaso terminal responsable del sangrado, con la infrecuente oclusión de las arterias

proximales, pueden relacionarse con la baja incidencia de complicaciones atribuibles al procedimiento; sin embargo, por el reducido número de pacientes puede existir un sesgo de selección.

Otras complicaciones no relacionadas con el procedimiento endovascular fueron la sepsis por endometritis, la falla renal y el síndrome de dificultad respiratoria. Esto es similar a lo informado por otros autores (18,29-31) y resulta fácil de explicar por la gravedad de este tipo de pacientes y las intervenciones requeridas para su manejo, como transfusiones múltiples y grandes volúmenes de fluidos intravenosos. Todas las pacientes de esta serie requirieron la administración de un número elevado de componentes sanguíneos, en promedio, 5 unidades de glóbulos rojos empacados, 6 unidades de plasma, 6 de crioprecipitado y una mediana de 6 unidades de plaquetas (rango: 6 a 12). La hemoglobina final fue de 9 g/dl, lo que evidencia la importante pérdida sanguínea inicial.

La necesidad de la histerectomía antes o después de la oclusión vascular se ha reportado previamente (9,32), incluidos los casos de necrosis uterina después del procedimiento (14,23,33). En dos casos, se requirió la histerectomía después de la oclusión vascular, motivada por la hipotonía uterina como causa adicional del sangrado o a la aparición de un hematoma gigante del ligamento ancho después de la histerectomía por placenta *accreta*.

Es difícil establecer los beneficios de una intervención específica en las pacientes con hemorragia posparto, en especial, cuando hasta la fecha no existen estudios aleatorizados para evaluar la oclusión vascular y se postula que el tratamiento inmediato según un protocolo parece ser la clave para obtener resultados positivos (34). En nuestra unidad, las indicaciones para la intervención endovascular han sido claramente establecidas: laceraciones vaginales complejas y hematoma retroperitoneal de muy difícil tratamiento.

La efectividad de esta estrategia terapéutica es de alrededor del 90 % (5,7,19,22,24,35,36), hallazgo confirmado en el presente estudio, en el cual solo dos pacientes presentaron sangrado persistente después de la ‘'embolización''. Las dos pacientes fueron remitidas en forma tardía (26 y 17 horas), recibieron múltiples transfusiones y presentaban coagulopatía clínica cuando se sometieron a 'embolización'. Una de ellas (caso Nº 3) tenía hemorragia posparto de etiología mixta, con laceración vaginal y atonía uterina, lo cual es una explicación adicional para la falla del tratamiento endovascular. La segunda paciente (caso Nº 9) requirió también histerectomía, con empaquetamiento pélvico y cierre diferido de la pared abdominal.

La aplicación precoz de la terapéutica apropiada influye directamente en las posibilidades de controlar el sangrado. El tratamiento tardío, cuando ya existe un grave compromiso sistémico, se asocia a la falla de la 'embolización' para controlar el sangrado (27,28), por lo cual es fundamental la rápida identificación de las pacientes candidatas a intervenciones complejas y su remisión oportuna.

El presente trabajo corresponde a la serie latinoamericana con el mayor número de casos de aplicación del manejo endovascular de hemorragia posparto por laceraciones pélvicas y muestra la efectividad de la técnica para detener la hemorragia, que previamente no pudo ser controlada mediante otros métodos en 9 de 11 pacientes gravemente enfermas. No se presentaron complicaciones asociadas con el procedimiento.

Es indispensable mejorar el sistema de alerta temprana en los casos de hemorragia posparto y el protocolo de remisión oportuna desde el nivel primario de atención hasta los centros de referencia con disponibilidad de opciones adicionales de tratamiento.

## Referencias


1. Alkema L, Chou D, Hogan D, Zhang S, Moller A-B, Gemmill A, *et al*. Global, regional, and national levels and trends in maternal mortality between 1990 and 2015, with scenario-based projections to 2030: A systematic analysis by the UN Maternal Mortality Estimation Inter-Agency Group. Lancet. 2016;387:462-74. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00838-7
2. Al-Zirqi I, Vangen S, Forsen L, Stray-Pedersen B. Prevalence and risk factors of severe obstetric haemorrhage. BJOG. 2008;115:1265-72. https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2008.01859.x
3. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice Bulletin: Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists Number 76, October 2006: postpartum hemorrhage. Obstet Gynecol. 2006;108:1039-47.
4. Sentilhes L, Vayssière C, Deneux-Tharaux C, Aya AG, Bayoumeu F, Bonnet M-P, *et al*. Postpartum hemorrhage: Guidelines for clinical practice from the French College of Gynaecologists and Obstetricians (CNGOF): In collaboration with the French Society of Anesthesiology and Intensive Care (SFAR). Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2016;198:12-21. https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2015.12.012
5. Doumouchtsis SK, Papageorghiou AT, Arulkumaran S. Systematic review of conservative management of postpartum hemorrhage: What to do when medical treatment fails. Obstet Gynecol Surv. 2007;62:540-7. https://doi.org/10.1097/01.ogx.0000271137.81361.93
6. Brown BJ, Heaston DK, Poulson AM, Gabert HA, Mineau DE, Miller FJ. Uncontrollable postpartum bleeding: A new approach to hemostasis through angiographic arterial embolization. Obstet Gynecol. 1979;54:361-5.
7. Ruiz FJ, Pintado MP, Álvarez A, Joigneau L, Pérez L, González M, *et al*. Outcomes of pelvic arterial embolization in the management of postpartum haemorrhage: A case series study and systematic review. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2016;206:12-21. https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.07.510
8. Likis FE, Sathe NA, Morgans AK, Hartmann KE, Young JL, Carlson-Bremer D, *et al*. Management of postpartum hemorrhage. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality; 2015.
9. Palacios-Jaraquemada JM. Efficacy of surgical techniques to control obstetric hemorrhage: Analysis of 539 cases. Acta Obstet Gynecol Scand. 2011;90:1036-42. https://doi.org/10.1111/j.1600-0412.2011.01176.x
10. Guzmán R, Vargas P, Astudillo J, Riveros R, Yamamoto M. Embolización selectiva de arterias uterinas en la resolución de patologías ginecológicas y emergencias obstétricas. Rev Chil Obstet Ginecol. 2011;76:76-85. https://doi.org/10.4067/S0717-75262011000200004
11. Eisele G, Sierre S, Malvino E. Hemorragias graves del postparto: tratamiento mediante embolización endovascular. Medicina Intensiva. 2002:19;1-5.
12. Ministerio de Salud y Protección Social. Análisis de Situación de Salud. Colombia 2015. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia; 2015. p. 86.
13. Maraux B, Ricbourg A, Brugier C, Chagnaud S, Fargeaudou Y, Rossignol M, *et al*. Hémorragie du post-partum liée à des plaies de la filière génitale: étude de 44 cas. Gynécologie Obstétrique & Fertilité. 2013;41:692-5. https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2012.09.027
14. Cheong JY, Kong TW, Son JH, Won JH, Yang JI, Kim HS. Outcome of pelvic arterial embolization for postpartum hemorrhage: A retrospective review of 117 cases. Obstet Gynecol Sci. 2014;57:17-27. https://doi.org/10.5468/ogs.2014.57.1.17
15. García V, González M, Cardona A, Ardila R. Asociación entre el nivel de fibrinógeno y severidad en la hemorragia posparto. Rev Colomb Anestesiol. 2015;43:136-41. https://doi.org/10.1016/j.rcae.2015.01.003
16. Poujade O, Zappa M, Letendre I, Ceccaldi PF, Vilgrain V, Luton D. Predictive factors for failure of pelvic arterial embolization for postpartum hemorrhage. Int J Gynaecol Obstet. 2012;117:119-23. https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2011.11.025

17. Touboul C, Badiou W, Saada J, Pelage J-P, Payen D, Vicaut E, *et al.* Efficacy of selective arterial embolisation for the treatment of life-threatening post-partum haemorrhage in a large population. PloS One. 2008;3:e3819. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003819

18. Ojala K, Perälä J, Kariniemi J, Ranta P, Raudaskoski T, Tekay A. Arterial embolization and prophylactic catheterization for the treatment for severe obstetric hemorrhage. Acta Obstet Gynecol Scand. 2005;84:1075-80. https://doi.org/10.1111/j.0001-6349.2005.00727.x

19. Uchiyama D, Koganemaru M, Abe T, Hori D, Hayabuchi N. Arterial catheterization and embolization for management of emergent or anticipated massive obstetrical hemorrhage. Radiat Med. 2008;26:188-97. https://doi.org/10.1007/s11604-007-0213-8

20. Fargeaudou Y, Soyer P, Morel O, Sirol M, le Dref O, Boudiaf M, *et al.* Severe primary postpartum hemorrhage due to genital tract laceration after operative vaginal delivery: Successful treatment with transcatheter arterial embolization. Eur Radiol. 2009;19:2197-203. https://doi.org/10.1007/s00330-009-1413-7

21. Kirby JM, Kachura JR, Rajan DK, Sniderman KW, Simons ME, Windrim RC, *et al.* Arterial embolization for primary postpartum hemorrhage. J Vasc Interv Radiol. 2009;20:1036-45. https://doi.org/10.1016/j.jvir.2009.04.070

22. Vegas G, Illescas T, Muñoz M, Pérez-Piñar A. Selective pelvic arterial embolization in the management of obstetric hemorrhage. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2006;127:68-72. https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2005.09.008

23. Cheng H-H, Tsang LL-C, Hsu T-Y, Kung C-T, Ou C-Y, Chang C-D, *et al.* Transcatheter arterial embolization as first-line rescue in intractable primary postpartum hemorrhage: Assessment, outcome, and subsequent fertility. J Formos Med Assoc. 2017;116:380-7. https://doi.org/10.1016/j.jfma.2016.06.011

24. Chauleur C, Fanget C, Tourne G, Levy R, Larchez C, Seffert P. Serious primary post-partum hemorrhage, arterial embolization and future fertility: A retrospective study of 46 cases. Hum Reprod. 2008;23:1553-9. https://doi.org/10.1093/humrep/den122

25. Palacios-Jaraquemada JM. Placental adhesive disorders. Berlín: De Gruyter; 2012. p. 161.

26. Palacios JM, García R, Barbosa NE, Ferle L, Iriarte H, Conesa HA. Lower uterine blood supply: Extrauterine anastomotic system and its application in surgical devascularization techniques. Acta Obstet Gynecol Scand. 2007;86:228-34. https://doi.org/10.1080/00016340601089875

27. Rosenthal DM, Colapinto R. Angiographic arterial embolization in the management of postoperative vaginal hemorrhage. Am J Obstet Gynecol. 1985;151:227-31.

28. Lee JS, Shepherd SM. Endovascular treatment of postpartum hemorrhage. Clin Obstet Gynecol. 2010;53:209-18. https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e3181ce09f5

29. Kim YJ, Yoon CJ, Seong NJ, Kang SG, An SW, Kim YS, *et al.* Failed pelvic arterial embolization for postpartum hemorrhage: Clinical outcomes and predictive factors. J Vasc Interv Radiol. 2013;24:703-9. https://doi.org/10.1016/j.jvir.2013.02.013

30. Yi KW, Oh M-J, Seo T-S, So KA, Paek YC, Kim H-J. Prophylactic hypogastric artery ballooning in a patient with complete placenta previa and increta. J Korean Med Sci. 2010;25:651-5. https://doi.org/10.3346/jkms.2010.25.4.651

31. Heaston DK, Mineau DE, Brown BJ, Miller FJ. Transcatheter arterial embolization for control of persistent massive puerperal hemorrhage after bilateral surgical hypogastric artery ligation. AJR Am J Roentgenol. 1979;133:152-4. https://doi.org/10.2214/ajr.133.1.152

32. Tsang ML, Wong WC, Kun KY, Tai CM, Ng TK, Lau KY, *et al.* Arterial embolisation in intractable primary post-partum haemorrhage: Case series. Hong Kong Med J. 2004;10:301-6.

33. Fargeaudou Y, Morel O, Soyer P, Gayat E, Sirol M, Boudiaf M, *et al.* Persistent postpartum haemorrhage after failed arterial ligation: Value of pelvic embolisation. Eur Radiol. 2010;20:1777-85. https://doi.org/10.1007/s00330-010-1713-y

34. Main EK, Goffman D, Scavone BM, Low LK, Bingham D, Fontaine PL, *et al.* National Partnership for Maternal Safety: Consensus bundle on obstetric hemorrhage. Anesth Analg. 2015;121:142-8. https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000000869

35. Matsubara S, Sato T, Nakata M. Vaginal artery embolization with a permanent embolic agent for intractable postpartum hemorrhage. J Obstet Gynaecol Res. 2011;37:377-8. https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2011.01527.x

36. Koganemaru M, Nonoshita M, Iwamoto R, Kuhara A, Nabeta M, Kusumoto M, *et al.* Endovascular management of intractable postpartum hemorrhage caused by vaginal laceration. Cardiovasc Intervent Radiol. 2016;39:1159-64. https://doi.org/10.1007/s00270-016-1309-2

Biomédica 2019;39:323-9
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4316

Artículo original

# Autoría de regalo: una aproximación a su frecuencia en una revista peruana

Jessica Hanae Zafra-Tanaka[1], Cristian Roca[2], Jorge Luis Cañari-Casaño[2], Ana Vargas-Calla[3]

[1] Centro de Excelencia en Enfermedades Crónicas, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú
[2] Facultad de Salud Pública, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú
[3] Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

**Introducción.** La autoría injustificada o 'autoría de regalo' es una práctica inadecuada que consiste en nombrar como autores a personas que no cumplen los criterios de autoría. Los informes de investigaciones científicas suelen ser publicados como artículos originales en revistas científicas y pueden presentar estas prácticas inadecuadas.
**Objetivos.** Determinar la prevalencia de autoría de regalo en publicaciones de artículos originales.
**Materiales y métodos.** Se trata de un estudio descriptivo en el cual se revisó la sección de contribuciones de autoría de todos los artículos publicados en una revista peruana desde enero de 2013 hasta marzo de 2017. Se consideró una autoría de regalo cuando un autor no cumplía con, al menos, uno de los criterios establecidos por el *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE).
**Resultados.** De los 209 artículos originales publicados, 11 fueron excluidos debido a que no reportaron las contribuciones de autoría. La prevalencia de autoría de regalo de los 198 artículos incluidos fue de 106 (53,5 %). Los criterios que menos cumplieron fueron la aprobación final del manuscrito (23,2 %), y su redacción y revisión crítica (16,8 %).
**Conclusiones.** Es necesario que las instituciones educativas capaciten a los investigadores para que discriminen entre autoría y contribución. Además, es necesario que las revistas soliciten y corroboren las contribuciones reportadas.

**Palabras clave**: autoría; escritura; artículo de revista; bibliometría; Perú.

**Gift authorship: An approach to its frequency in a Peruvian journal**

**Introduction:** Unjustified authorship or "gift authorship" is an inadequate practice of authorship that consists of naming as authors people who do not meet the authorship criteria. Reports of scientific research are often published as original articles in scientific journals and may present these inappropriate practices.
**Objective:** Determine the prevalence of gift authorship in original articles for publication.
**Materials and methods:.** Descriptive study in which the authorship contributions section of all the articles published between 2013 and the first quarter of 2017 in a Peruvian magazine was reviewed. Gift authorship was considered when an author did not meet at least one of the criteria established by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).
**Results:** Of the 209 original articles published, 11 were excluded because they did not report authorship contributions. The prevalence of gift authorship was 53.5% (106). The critreria least met were the final approval of the manuscript (23.2%) and the writing and critical review of this manuscript. (16.8%).
**Conclusions:** It is necessary that educational institutions train researchers to distinguish between authorship and contribution. In addition, it is necessary that the journals request and corroborate the reported contributions.

**Keywords:** authorship, writing; journal article; bibliometrics; Perú.

La asignación correcta de las autorías en el informe de una investigación científica es importante porque refleja un logro académico e implica el financiamiento y la responsabilidad sobre lo publicado (1,2). Estos informes suelen ser publicados en formatos de artículos originales en las revistas científicas. En el 2013, el *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE) planteó los criterios que se deben cumplir para ser considerado como autor de una publicación científica, los cuales se actualizaron en el 2017 (1,3). En ambos se definió a un autor como aquella persona que hace contribuciones substanciales al trabajo de investigación (diseño del estudio, adquisición, análisis o interpretación de los datos), participa de la redacción del manuscrito,

**Recibido:** 02/02/18
**Aceptado:** 20/09/18
**Publicado:** 25/09/18

**Citación:**
Zafra-Tanaka JH, Roca C, Canari-Casano JL, Vargas-Calla A. Autoría de regalo: una aproximación a su frecuencia en una revista peruana. Biomédica. 2019;39:323-9.
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4316

**Correspondencia:**
Jessica Hanae Zafra-Tanaka, Avenida Conquistadores N° 365, San Isidro Lima, Perú
Teléfono: (51) (99) 437 1991
j.zafra.t@gmail.com

**Contribución de los autores:**
Todos los autores participaron en el diseño del estudio, la recolección de datos, el análisis y la interpretación de los resultados, y en la redacción del manuscrito.

**Financiación:**
El presente estudio no recibió ninguna subvención específica de ninguna agencia de financiamiento. Jessica Hanae Zafra-Tanaka recibió apoyo financiero de CRONICAS, Centro de Excelencia en Enfermedades Crónicas a través de la beca CRONICAS 2017. Cristian Roca recibió capacitación en el programa de entrenamiento "*Infectious Diseases Training Program in Bolivia: South-South Training with Perú*" NIH/Fogarty (5D43TW010074-04). Ana Vargas Calla recibió capacitación en el programa "*Training in Infectious Diseases in Perú - Time for Capacity Strengthening in Clinical Research*" (5D43TW001140).

**Conflicto de intereses:**
Los investigadores no tienen conflictos de intereses que declarar.

aprueba su versión final, y acepta responsabilidad sobre la precisión e integridad de lo que se publica. Además, se hizo la distinción entre autores, es decir, aquellos que cumplen con los criterios, y contribuyentes, aquellas personas que hicieron algún aporte sin llegar a cumplir con todos (1).

Durante el proceso de investigación científica los investigadores pueden incurrir en prácticas inadecuadas de autoría. Si bien existen diversas maneras de clasificar las prácticas inadecuadas de autoría, estas se podrían dividir en la autoría injustificada o 'de regalo' y la autoría fantasma (4). La primera se refiere a asignarle una autoría a alguien que no cumple con los criterios de autoría (1). Esto puede deberse a un acuerdo recíproco entre autores para colocarse mutuamente en sus publicaciones o al hecho de colocar como autor a un investigador renombrado con la finalidad de aumentar el prestigio del trabajo, ganar visibilidad y pasar fácilmente la revisión por pares, o considerar como autor a alguien por respeto o gratitud (5,6); también, puede deberse a miedo, intimidación, obligación o falta de conocimiento (5). La autoría fantasma, por su parte, se refiere a no asignarle una autoría a alguien que cumplió con los criterios para ser autor (4).

Se han realizado diversos estudios sobre la prevalencia de la autoría de regalo (7-10), y se han hallado prevalencias que varían de 6,0 a 89,0 % en artículos originales. La autoría de regalo se observa en diversos tipos de publicaciones: artículos originales (16 %) (10), protocolos de ensayos clínicos (33 %) (8) y revisiones sistemáticas Cochrane (41 %) (9). Además, no solo se ha informado en revistas de baja difusión, sino también en revistas de alta difusión como: *Annals of Internal Medicine* (15,5 %), *Journal of the American Medical Association* (16,7 %), *New England Journal of Medicine* (12,2 %), *Lancet* (19,7 %), *Plos One* (22,8 %) o *Nature Medicine* (29,3 %); la mayor proporción se presenta en los artículos originales (25 %), en comparación con las revisiones narrativas o sistemáticas (15 %) (10).

Perú incrementó el número de publicaciones científicas entre los años 2000 y 2009, según un estudio que revisó las publicaciones indizadas en *ISI Web of Knowledge* (11) y, teniendo en cuenta las publicaciones entre 2007 y 2016, se encontraba en el octavo puesto en Latinoamérica según el *ranking* de los países elaborado por Scimago (12). La producción científica debe estar liderada por investigadores que se ciñan a las buenas prácticas y a los estándares internacionales, sin embargo, se han documentado problemas de autoría inadecuada. Así en un reporte de casos de un hospital del seguro social, se presentó un caso en el cual el jefe del servicio donde se realizó una investigación quería ser autor de la publicación sin haber participado en ella (13). Esto refleja problemas como la falta de conocimiento de los criterios de autoría, la confusión entre responsabilidad administrativa y autoría, o las exigencias inadecuadas.

Diversos problemas pueden desencadenarse debido a las prácticas inadecuadas de autoría. Por ejemplo, el caso de Andrew Wakefield ejemplifica como, de haber cumplido con sus responsabilidades, los coautores habrían revisado en detalle el contenido del artículo científico y se hubiera podido evitar la publicación de resultados fraudulentos y las consecuencias en salud pública que trajo la publicación de aquel informe (14).

Por ello, el presente estudio tuvo como objetivo estimar la frecuencia de la autoría de regalo de los artículos originales publicados desde enero de 2013 hasta marzo de 2017 en una revista peruana, según las recomendaciones establecidas por el ICMJE, con el propósito de tener una aproximación de la magnitud del problema y proponer medidas de prevención y control.

## Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio descriptivo en el cual se analizó la sección de contribuciones de autoría de los artículos originales publicados en los últimos cinco años (2013-2017) en la *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. Esta revista publica cuatro números al año, por lo cual se incluyeron todos los números publicados en los años 2013 a 2016 y el primer número publicado en el 2017. Se incluyeron todos los artículos originales, y se excluyeron las revisiones narrativas, los editoriales, las cartas al editor y los simposios. Además, se excluyeron aquellos artículos que no presentaron la sección de contribuciones de autoría.

Se eligió la *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública,* ya que es la revista de salud pública más importante del Perú y una de las pocas que publican la sección de contribuciones de autoría. Desde el 2000 está indizada en Medline/Index Medicus, una de las bases de datos más rigurosas del ámbito científico a nivel mundial (15). Además, consideramos que refleja de forma adecuada las publicaciones científicas en el área de ciencias de la salud de Perú.

Para la recolección de los datos, se recuperaron todos los artículos originales desde la página web de la *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* y se diseñó una plantilla con el programa Excel™ en la cual se recolectó la siguiente información: título del artículo, código doi, número de autores, año de publicación del artículo, número y volumen de la revista. Además, se evaluaron los criterios de autoría para cada uno de los autores de cada artículo científico. La variable numérica que se incluyó fue el número de autores y las variables categóricas fueron los criterios de autoría, analizados para cada autor, el año de publicación y la presencia de autoría de regalo.

La sección de contribuciones de los autores fue evaluada por dos revisores de forma independiente para determinar si estos cumplían con los criterios establecidos por el *International Committee of Medical Journal Editors*. Posteriormente, estas evaluaciones fueron contrastadas y, en caso de discordancias, se revisó nuevamente el artículo y ambos revisores lo discutieron hasta llegar a un consenso.

### *Variables de estudio*

Se definió como autoría de regalo la inclusión como autores de quienes no cumplían con todos los criterios establecidos por el *International Committee of Medical Journal Editors* (1). Estos mismos criterios son requisitos establecidos para publicar artículos originales en la *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. (16). Solo se consideró como autor a aquella persona que cumplía con todos los criterios citados a continuación:

- contribuciones significativas a la concepción o diseño del manuscrito, o a la recolección, el análisis o la interpretación de los datos;
- redacción o revisión crítica importante del contenido del manuscrito;
- aprobación final de la versión publicada, y
- asunción de responsabilidad de la publicación.

Se consideró que todos los autores cumplían con el último criterio ya que, como parte del proceso de publicación, la revista solicita una declaración

juramentada en la que los autores firman y se hacen responsables de todos los aspectos del manuscrito. En los casos en los que no se mencionó alguno de los criterios en la sección de contribución de autoría, se consideró que estos no se habían cumplido. Se consideró que un artículo tenía autores de regalo cuando al menos un autor no cumplía con alguno de los tres primeros criterios del *International Committee of Medical Journal Editors*.

Además, se estudiaron otras variables, como el número de autores por artículo y el año de su publicación.

### *Análisis de procesamiento de datos*

Se hizo un análisis descriptivo de los datos. Las variables categóricas (cumplimiento de cada criterio de autoría del *International Committee of Medical Journal Editors* y presencia de autoría de regalo en el artículo original) se sintetizaron mediante frecuencias y porcentajes. La variable cuantitativa (número de autores por artículo) se sintetizó con medidas de tendencia central y dispersión, como la mediana y los rangos. Los análisis se hicieron con el *software* estadístico Stata™, versión 12.

### *Aspectos éticos*

Se mantuvo la confidencialidad de los datos al no colocar el nombre de los autores ni ninguna forma de identificación de los artículos estudiados en el manuscrito.

## Resultados

Se revisaron 209 artículos originales publicados desde enero de 2013 hasta marzo de 2017. Estos contaron con un total de 1.062 autores. Once (5,3 %) artículos fueron excluidos del análisis por no presentar la sección de contribuciones de autoría. La mediana del número de autores por artículo fue de 5, y el rango entre 1 y 26. De los 198 artículos incluidos, 106 (53,7 %) presentaron al menos un autor que no cumplía los criterios de autoría del *International Committee of Medical Journal Editors*. Se observó una tendencia a la disminución del número de artículos con autorías de regalo en los años 2016 a 2017, es decir, los dos últimos años analizados (figura 1).

En los 198 artículos incluidos hubo un total de 1.003 autores. Del total de autores, 377 (37,6 %) no cumplieron alguno de los criterios de autoría, 112 (11,2 %) no cumplían el criterio de “contribuciones significativas a la concepción o diseño del manuscrito, o a la recolección, análisis o interpretación de los datos”, 169 (16,8 %) no cumplían el criterio de “redacción o revisión crítica importante del contenido del manuscrito” y 233 (23,2 %) no cumplían el criterio de “la aprobación final de la versión publicada”.

## Discusión

En este estudio se halló que cinco de cada diez artículos poseían, al menos, una autoría de regalo. Entre los criterios que menos se cumplían se encontraron la redacción o revisión crítica del manuscrito y su aprobación final.

En el presente estudio, la prevalencia de autoría de regalo fue de 53,7 %, la cual se encuentra dentro del rango hallado en otros estudios: 17,6 a 89 % de artículos originales con autorías de regalo (7-10). Así, en un estudio realizado en seis revistas de alto impacto (*Journal of the American Medical Association*, *New England Journal of Medicine, Nature Medicine*, *Annals of*

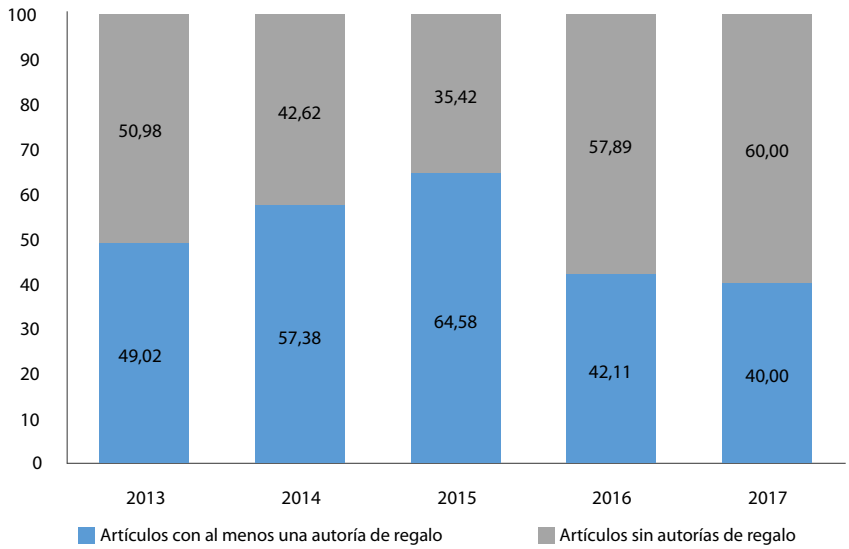



**Figura 1.** Proporción de artículos con autorías de regalo en los últimos cinco años

*Internal Medicine*, *Lancet* y *PLoS Medicine*) se halló una prevalencia de 17,6 % (10) y, en un estudio que incluyó artículos publicados en revistas iraníes, dicha prevalencia fue de 89 % (7). Sin embargo, la metodología empleada en esos estudios fue distinta a la aquí utilizada, ya que en aquellos se contrastaron las autorías de los artículos publicados con información brindada por los autores corresponsales mediante una encuesta realizada de forma virtual.

En este estudio, los criterios de autoría que no cumplían la mayoría de los autores fueron la redacción o revisión del manuscrito (17 %) y la aprobación de la versión final (23 %). Esto es similar a lo hallado en un estudio de Cochrane, en el que los criterios del *International Committee of Medical Journal Editors* que menos se cumplían fueron el criterio de redacción o revisión del manuscrito (22 %) y el criterio de aprobación de la versión final (18 %) (9). Es posible que estos criterios no se cumplan debido a las múltiples modificaciones por las que pasa un manuscrito durante el proceso de publicación, en el cual es posible que los autores aprueben la versión enviada para publicación, pero no así la versión final después de las correcciones o modificaciones sugeridas por los revisores. Además, es posible que ciertos cambios mínimos realizados por el editor solo sean aprobados por el autor corresponsal.

Otros motivos por los cuales se puede incurrir en autoría de regalo, es que se invite a ser autor de un artículo a personas que desarrollan labores que podrían ser consideradas dentro del primer criterio, como reclutar sujetos de estudio, obtener financiamiento o material de estudio, supervisar o hacer ilustraciones. Estos tipos de apoyo pueden mencionarse en la sección de agradecimientos del manuscrito, mas no debe considerarse como autor al que los brinda, debido a que no ha tenido una contribución sustancial al desarrollo de la investigación (5). Además, la falta de conocimiento de los criterios de autoría podría generar autoría de regalo. En este sentido, en un estudio en *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, se encontró que la autoría de regalo percibida fue de 18 %, mientras que la real, aquella obtenida siguiendo los criterios del *International Committee of Medical Journal Editors*, fue del 55 % (17). Por otro lado, en un estudio de la revista *Radiology*, se informó una asociación entre incurrir en autoría de regalo y no haber tenido cursos o charlas sobre ética en investigación (18).

En este estudio se apreció una ligera disminución de la proporción de artículos con autoría de regalo durante los últimos años evaluados. Ello podría obedecer a un mejor control de la revista al recibir los manuscritos o a un mejor conocimiento de las buenas prácticas de asignación de autoría de los investigadores.

Una limitación del presente estudio es que no se pudo comprobar si las contribuciones reportadas eran reales. Las autorías reportadas en la sección de contribuciones de autoría de la revista, podrían no ser reales debido a que:

1. los autores pueden tratar de adjudicar todos los criterios a todos los autores, ya que es un requisito de la revista;
2. puede existir una falla en el reporte de las contribuciones, a pesar de que esto se recalca en las instrucciones para los autores, o en la declaración juramentada que se presenta para la remisión de los manuscritos a la revista, o
3. los editores de la revista pueden haber descartado algunos manuscritos por no cumplir con los criterios de autoría, lo cual nos indicaría que el problema es mucho mayor al hallado en este estudio.

Por estos motivos, no se puede afirmar si este estudio sobrevaloró o subestimó los valores reales de autoría de regalo. Sin embargo, consideramos que esta primera aproximación es útil, ya que refleja la magnitud del problema.

El presente estudio documenta el problema de la autoría de regalo como una práctica inadecuada llevada a cabo con frecuencia. Se recomienda a las instituciones educativas que forman investigadores que incluyan cursos o capacitación en conducta responsable. De esta manera, los investigadores estarían en capacidad de discriminar entre aquellas personas que cumplen los criterios de autoría y quienes no lo hacen. Estos últimos deberían ser nombrados en la sección de “Agradecimientos”, listando sus contribuciones.

En cuanto a los editores de la revista, es recomendable solicitar al autor corresponsal que cite las contribuciones de cada autor. Esto permitiría evidenciar el grado de participación de cada autor en la investigación. Además, se recomienda que verifiquen el cumplimiento de los criterios de autoría.

En conclusión, la alta prevalencia de autoría de regalo encontrada, nos indica que es necesario tomar medidas educativas para que los investigadores asignen de manera correcta las autorías, así como medidas de control por parte de los editores de las revistas para evitar que estos problemas continúen presentándose.

## Agradecimientos

Agradecemos a Liz Veramendi-Espinoza y a Fanny Tanaka-Gondo por las sugerencias para mejorar la redacción del manuscrito. Agradecemos las revisiones de los evaluadores que resultaron en mejoras sustantivas de este manuscrito.

## Referencias

1. International Committe of Medical Journal Editors (ICMJE). Defining the role of authors and contributors 2018. Fecha de consulta: 28 de octubre de 2018. Disponible en: http://www.icmje.org/recommendations/browse/roles-and-responsibilities/defining-the-role-of-authors-and-contributors.html
2. Wager E. Recognition, reward and responsibility: Why the authorship of scientific papers matters. Maturitas. 2009;62:109-12. https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2008.12.001

3. International Committe of Medical Journal Editors (ICMJE). The New ICMJE recommendations (August, 2013). Fecha de consulta: 28 de octubre de 2018. Disponible en: http://www.icmje.org/news-and-editorials/new_rec_aug2013.html
4. Teixeira da Silva JA, Dobranszki J. Multiple authorship in scientific manuscripts: Ethical challenges, ghost and guest/gift authorship, and the cultural/disciplinary perspective. Sci Eng Ethics. 2016.;22:1457-72. https://doi.org/10.1007/s11948-015-9716-3
5. Slone RM. Coauthors' contributions to major papers published in the AJR: Frequency of undeserved coauthorship. Am J Roentgenol. 1996;167:571-9. https://doi.org/10.2214/ajr.167.3.8751654
6. Kulakowski EC, Chronister LU. Research administration and management. Sudbury, MA: Jones and Bartlett Publishers; 2008.
7. Mirzazadeh A, Navadeh S, Rokni M, Farhangniya M. The prevalence of honorary and ghost authorships in iranian bio-medical journals and its associated factors. Iran J Public Health. 2011;40:15-21.
8. Roper N, Korenstein D. Industry collaboration and primary guest authorship of high-impact randomized clinical trials: A cross-sectional study. J Gen Intern Med. 2015;30:1421-5. https://doi.org/10.1007/s11606-015-3299-1
9. Mowatt G, Shirran L, Grimshaw JM, Rennie D, Flanagin A, Yank V, *et al*. Prevalence of honorary and ghost authorship in Cochrane reviews. JAMA. 2002;287:2769-71. https://doi.org/10.1001/jama.287.21.2769
10. Wislar JS, Flanagin A, Fontanarosa PB, Deangelis CD. Honorary and ghost authorship in high impact biomedical journals: A cross sectional survey. BMJ. 2011;343:d6128. https://doi.org/10.1136/bmj.d6128
11. Huamaní C, Mayta-Tristán P. Producción científica peruana en medicina y redes de colaboración, análisis del Science Citation Index 2000-2009. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2010;27:315-25.
12. Scimago Lab Scopus. Scimago Journal and Country Rank. 2007-2018. Fecha de consulta: 28 de octubre de 2018. Disponible en: https://www.scimagojr.com/countryrank.php?region=Latin%20America
13. Valenzuela G. Irregularidades en la publicación de trabajos científicos. An Fac Med. 2008:69:56-8.
14. Rao TSS, Andrade C. The MMR vaccine and autism: Sensation, refutation, retraction, and fraud. Indian J Psychiatry. 2011;53:95-6. https://doi.org/10.4103/0019-5545.82529
15. Burstein Z, Mayta-Tristan P. The Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública now indexed in MEDLINE/Index Medicus. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2010;27:312-4.
16. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. Instrucciones al autor 2018. Fecha de consulta: 28 de octubre de 2018.. Disponible en: http://www.rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/pages/view/instrucciones
17. Rajasekaran S, Shan RL, Finnoff JT. Honorary authorship: Frequency and associated factors in physical medicine and rehabilitation research articles. Arch Phys Med Rehabil. 2014;95:418-28. https://doi.org/10.1016/j.apmr.2013.09.024
18. Eisenberg RL, Ngo LH, Bankier AA. Honorary authorship in radiologic research articles: Do geographic factors influence the frequency? Radiology. 2014;271:472-8. https://doi.org/10.1148/radiol.13131710

Biomédica 2019;39:330-8
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4258

Artículo original

# Vigilancia por el laboratorio de la tuberculosis resistente en menores de 15 años, Colombia, 2010 a 2015

Angie Zabaleta, Claudia Llerena, Angélica Valbuena

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

**Introducción.** La tuberculosis en los niños es un reflejo de transmisión reciente en la comunidad. Se estima que en el mundo cada año un millón de niños enferma por esta causa; en Colombia se notificaron 291 casos en el 2015.
**Objetivo.** Actualizar la información obtenida de las actividades de vigilancia por el laboratorio de la farmacorresistencia del bacilo *Mycobacterium tuberculosis* en menores de 15 años en Colombia entre el 2010 y el 2015.
**Materiales y métodos.** Se llevó a cabo un estudio retrospectivo de corte transversal. Se estudiaron las variables de procedencia, sexo, edad, tipo de tuberculosis y estado de HIV en los casos sensibles y resistentes. Estos se clasificaron como caso nuevo sin tratamiento o caso previamente tratado para analizar el perfil de resistencia a fármacos de primera y segunda línea.
**Resultados.** De los 3.440 casos notificados, en el 16,4 % se practicó la prueba de sensibilidad. El 50,6 % eran mujeres, la forma pulmonar se presentó en el 70,6 % y el 1,4 % presentó coinfección de tuberculosis y HIV. Se estudiaron 565 casos, de los cuales 503 (89,0 %) eran nuevos: el 3,9 % con tuberculosis multirresistente y el 9,5 % con resistencia global. Los previamente tratados fueron 62 (10,9 %), 4,8 % con multirresistencia y 19,3 % con resistencia global. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en los años estudiados. La proporción de tuberculosis extremadamente resistente en los casos nuevos evaluados fue de 9,0 %.
**Conclusiones.** Es necesario que el Ministerio de Salud y Protección Social y el Instituto Nacional de Salud promuevan el uso de pruebas diagnósticas rápidas y muy sensibles, como las moleculares recomendadas por la Organización Mundial de la Salud.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*; antituberculosos; tuberculosis resistente a múltiples medicamentos; tuberculosis extensivamente resistente a drogas; niño; Colombia.

**Resistant tuberculosis in children under 15 years of age, Colombia 2010-2015**

**Introduction:** Tuberculosis in children is a recent transmission reflection in the community. It is estimated that every year one million children get sick in the world because of this. In Colombia, 291 cases were notified in 2015.
**Objective:** To update the information obtained from the surveillance activities of the drug-resistance laboratory in children younger than 15 years of age in Colombia between 2010 and 2015.
**Materials and methods:** This was a cross-sectional retrospective study. We studied the variables of origin, gender, age, type of tuberculosis, and HIV status in sensitive and resistant cases. We classified them according to their treatment background between new and previously treated to analyze their first and second line drug resistance profile.
**Results:** From the notified cases, 16.4 % had a sensitivity test. 50.6 % were women, the pulmonary form was present in 70.6% cases, and 1.4 % presented with tuberculosis/HIV coinfection. We studied 565 cases, from which 503 (89.1 %) were new, presenting with multidrug-resistant tuberculosis, and a global resistance of 3.9 % and 9.5 %, respectively. From them, 62 had been previously treated (10.9 %), with 4.8 % and 19.3 % multidrug resistance and global resistance, respectively. There was no evidence of statistically significant differences during the studied years. Extremely resistant tuberculosis in new cases was 9.0 %.
**Conclusions:** It is necessary for the *Ministerio de Salud y Protección Social* and the *Instituto Nacional de Salud* to promote the use of faster and more sensitive diagnostic tests such as the molecular ones recommended by the World Health Organization.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*; antitubercular agents; tuberculosis, multidrug-resistant; extensively drug-resistant tuberculosis; child; Colombia.

**Recibido:** 25/01/18
**Aceptado:** 20/09/18
**Publicado:** 26/09/18

**Citación:**
Zabaleta AP, Llerena C, Valbuena A. Vigilancia por el laboratorio de la tuberculosis resistente en menores de 15 años, Colombia, 2010 a 2015. Biomédica. 2019;39:330-8.
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4258

**Correspondencia:**
Angie Paola Zabaleta, Grupo de Micobacterias, Dirección Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (1) 220 7700, extensión 1260
azabaleta@ins.gov.co

**Contribución de los autores:**
Todas las autoras participaron en el diseño del protocolo, la recolección y el análisis de la información, la redacción y la revisión del artículo.

**Financiación:**
Este trabajo se llevó a cabo con recursos del contrato 757/13 celebrado entre el Departamento Administrativo de Ciencia y Tecnología de Colciencias y la Dirección de Redes en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud.

**Conflicto de intereses:**
Las autoras del presente artículo no tienen ningún tipo de conflicto de intereses financieros, académicos ni personales, que puedan afectar su validez.

Los casos de tuberculosis resistente en la población infantil reflejan la transmisión reciente de cepas de adultos en la comunidad. Se estima que cada año un millón de niños enferma por el bacilo de la tuberculosis, solo uno de cada tres es diagnosticado, el 99 % de los que inician tratamiento sobrevive y el 22 % de los no tratados muere (1).

En el 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS) notificó 6,1 millones de casos nuevos y recaídas de tuberculosis en el mundo, de los cuales el 6,3 % correspondió a menores de 15 años. Además, se registraron 132.120 casos de tuberculosis multirresistente (*Multidrug-resistant TB,* MDR-TB) y resistente a rifampicina, de los cuales se estima que 32.000 eran niños (1,2). En ese mismo año en Colombia se notificaron 12.918 casos de todas las formas de tuberculosis al Sistema de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila); de estos, 291 (2,2 %) correspondieron a menores de 15 años y tres presentaron tuberculosis multirresistente (3).

En el 2010, Llerena, *et al*., describieron la situación de la tuberculosis resistente en los menores de 15 años en Colombia; la resistencia global en los niños sin antecedentes de tratamiento fue de 21,1% y en aquellos con tuberculosis multirresistente, de 6,5%; no se encontró resistencia en los previamente tratados (4).

En Colombia son pocos los estudios realizados para conocer la prevalencia de la resistencia a los fármacos en la población infantil. El objetivo del presente trabajo fue actualizar la información obtenida de las actividades de vigilancia por el laboratorio de la farmacorresistencia en personas menores de 15 años en Colombia en un periodo de seis años.

**Materiales y métodos**

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo de corte transversal en menores de 15 años con tuberculosis pulmonar o extrapulmonar entre el 2010 y el 2015 en Colombia.

Se incluyeron 565 menores de 15 años que tenían un cultivo positivo para el complejo *Mycobacterium tuberculosis* y una prueba de sensibilidad a los fármacos antituberculosis de primera y segunda línea con resultado de sensible o resistente; 35 no pudieron interpretarse o se habían contaminado.

Las fuentes de información fueron el formato único de vigilancia de las micobacterias, que se recibe en el Laboratorio Nacional de Referencia con los datos básicos de cada persona, la base de datos de pruebas de sensibilidad del mismo laboratorio y los informes de tuberculosis del Sivigila.

Para el análisis de los datos, los casos se dividieron en tres grupos: con tuberculosis sensible a la isoniacida y la rifampicina, con tuberculosis resistente a la isoniacida, o con tuberculosis multirresistente, resistente a la rifampicina o ambos. Se analizaron las siguientes variables: procedencia del cultivo según la entidad territorial, sexo, edad, tipo de tuberculosis, muestra procesada, coinfección con HIV y patrón de sensibilidad a los fármacos de primera y segunda línea.

Se calcularon las medidas de tendencia central y dispersión para las variables numéricas y porcentajes para las categóricas, diferenciando entre los tres grupos. Se practicaron las pruebas de diferencia de proporciones y de medias para determinar las diferencias de las variables entre estos grupos, con una confianza del 95 % y una significación estadística de $p<0,05$.

Para el análisis del perfil de resistencia a los fármacos antituberculosis, se diferenció entre casos nuevos y previamente tratados, se calcularon los porcentajes de los casos con prueba de sensibilidad a los fármacos de primera línea con respecto a lo notificado por el Sivigila, los casos de tuberculosis multirresistente y resistente a la rifampicina con pruebas de sensibilidad a los fármacos de segunda línea, resistencia global a los fármacos de primera (isoniacida y rifampicina) y segunda línea (kanamicina, amikacina, capreomicina y ofloxacina), la resistencia por cada fármaco, la tuberculosis multirresistente y resistente a la rifampicina y la tuberculosis extremadamente resistente (*Extensively Drug-Resistant Tuberculosis,* XDR-TB) entre los casos multirresistentes.

Las metodologías utilizadas por la Red Nacional de Laboratorios para determinar la sensibilidad a los fármacos antituberculosis fueron: proporciones múltiples en medio de Löwenstein-Jensen y en capa delgada, Bactec MGIT™, Genotype MTBDR plus V2™ y Xpert MTB RIF™.

Los datos se organizaron, se tabularon y se analizaron con las herramientas de Excel™ y Epidat 3.1™.

### *Aspectos éticos*

Según la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social, la información obtenida por el Instituto Nacional de Salud en este estudio hace parte de las actividades de vigilancia de la farmacorresistencia, y el estudio se clasifica como una investigación sin riesgo debido a que es un análisis retrospectivo y no se hizo ninguna intervención intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, sicológicas o sociales de los menores.

## Resultados

Al comparar los casos notificados al Sivigila de los menores de 15 años y las pruebas de sensibilidad a los fármacos antituberculosis, se encontró que se conocía el perfil de resistencia solo en 82 (13,1 %) de los 624 casos notificados en el 2010, en 83 (11,6 %) de los 714 casos en el 2011, en 96 (15,1 %) de los 636 casos en el 2012, en 104 (18,1 %) de los 575 casos en el 2013, en 110 (18,3 %) de los 600 casos en el 2014 y en 90 (30,9 %) de los 291 en el 2015.

En total, durante los seis años analizados se notificaron 3.440 casos al Sivigila, a 565 (16,4 %) de los cuales se les practicaron pruebas de sensibilidad a los fármacos. Se observó un incremento a partir del 2013 con respecto a lo registrado en los dos años anteriores ($p<0,05$) y el mayor porcentaje de evaluados se alcanzó en el 2015 ($p<0,05$) (3,5-9).

De estos 565 casos, 286 (50,6 %) correspondía a mujeres y no se encontraron diferencias estadísticas entre los tres grupos etarios evaluados (cuadro 1).

De los menores de 15 años analizados, el menor número de casos de tuberculosis resistente a la isoniacida se presentó en el grupo de los 6 a los 10 años ($p<0,05$), comparado con el grupo etario de 0 a 5, y el de 11 a 15 años. En los casos de MDR-TB o de resistencia a la rifampicina, no hubo diferencias significativas entre los tres grupos de edad ($p=0,081$) (cuadro 1).

La tuberculosis fue pulmonar en 399 (70,6 %) casos (cuadro 1). Estos se distribuyeron así: en el grupo de 0 a 5 años, 170 de 219 (77,6 %); en el de 6 a 10 años, 81 de 129 (63 %) y, en el de 11 a 15 años, 172 de 217 (79,2 %). La tuberculosis pulmonar fue menos frecuente en el grupo de 6 a10 años ($p<0,05$).

**Cuadro 1.** Descripción de variables sociodemográficas en 565 casos de tuberculosis en menores de 15 años, Colombia, 2010 a 2015

| Variable | Sensibles (n=505) n (%) | Resistentes a isoniacida (n=32) n (%) | p | Multirresistentes y resistentes a rifampicina (n=28) n (%) | p | Total (n=565) n (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Sexo | | | | | | |
| Hombre | 245 (48,5) | 18 (56,3) | 0,505 | 13 (46,4) | 0,983 | 276 (48,8) |
| Mujer | 257 (50,9) | 14 (43,7) | 0,547 | 15 (53,6) | 0,934 | 286 (50,6) |
| Sin dato | 3 (0,6) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | | 3 (0,5) |
| Edad (años) | | | | | | |
| 0-5 | 197 (39,0) | 10 (31,3) | 0,491 | 12 (42,9) | 0,836 | 219 (38,8) |
| 6-10 | 119 (23,6) | 5 (15,6) | 0,413 | 5 (17,9) | 0,641 | 129 (22.8) |
| 11-15 | 189 (37,4) | 17 (53,1) | 0,113 | 11 (39,3) | 0,997 | 217 (38,4) |
| Rango | <1-15 | <1-15 | | <1-15 | | <1-15 |
| Mediana | 8 | 10 | | 8 | | 8 |
| Forma de tuberculosis | | | | | | |
| Pulmonar | 359 (71,1) | 21 (65,6) | 0,646 | 19 (67,9) | 0,876 | 399 (70,6) |
| Extrapulmonar | 131 (25,9) | 9 (28,1) | 0,947 | 6 (21,4) | 0,756 | 146 (25,8) |
| Sin dato | 15 (3,0) | 2 (6,3) | | 3 (10,7) | | 20 (3,5) |
| Coinfección tuberculosis/HIV | | | | | | |
| Sí | 2 (0,4) | 0 (0,0) | 0,254 | 0 (0,0) | 0,209 | 2 (0,4) |
| No | 129 (25,5) | 7 (21,9) | 0,800 | 9 (32,1) | 0,579 | 145 (25,7) |
| Sin dato | 374 (74,1) | 25 (78,1) | 0,762 | 19 (67,9) | 0,613 | 418 (74,0) |
| Entidad territorial | | | | | | |
| Antioquia | 169 (33,5) | 11 (34,4) | | 12 (42,9) | | 192 (34,0) |
| Valle del Cauca | 90 (17,8) | 8 (25,1) | | 11 (39,3) | | 109 (19,3) |
| Atlántico | 58 (11,5) | 1 (3,1) | | 1 (3,6) | | 60 (10,6) |
| Bogotá, D.C. | 44 (8,7) | 2 (6,3) | | 2 (7,1) | | 48 (8,5) |
| Risaralda | 33 (6,5) | 3 (9,4) | | 1 (3,6) | | 37 (6,5) |
| Santander | 13 (2,6) | 0 | | 0 | | 13 (2,3) |
| Amazonas | 11 (2,2) | 1 (3,1) | | 0 | | 12 (2,1) |
| Meta | 12 (2,4) | 0 | | 0 | | 12 (2,1) |
| Norte de Santander | 10 (2,0) | 1 (3,1) | | 0 | | 11 (1,9) |
| La Guajira | 9 (1,8) | 1 (3,1) | | 0 | | 10 (1,8) |
| Cesar | 7 (1,4) | 1 (3,1) | | 0 | | 8 (1,4) |
| Nariño | 7 (1,4) | 1 (3,1) | | 0 | | 8 (1,4) |
| Guaviare | 6 (1,2) | 0 | | 0 | | 6 (1,1) |
| Caldas | 4 (0,8) | 1 (3,1) | | 0 | | 5 (0,9) |
| Chocó | 3 (0,6) | 1 (3,1) | | 1 (3,6) | | 5 (0,9) |
| Putumayo | 5 (1,0) | 0 | | 0 | | 5 (0,9) |
| Caquetá | 4 (0,8) | 0 | | 0 | | 4 (0,7) |
| Cauca | 4 (0,8) | 0 | | 0 | | 4 (0,7) |
| Quindío | 4 (0,8) | 0 | | 0 | | 4 (0,7) |
| Arauca | 3 (0,6) | 0 | | 0 | | 3 (0,5) |
| Huila | 3 (0,6) | 0 | | 0 | | 3 (0,5) |
| Boyacá | 2 (0,4) | 0 | | 0 | | 2 (0,4) |
| Vaupés | 2 (0,4) | 0 | | 0 | | 2 (0,4) |
| Casanare | 1 (0,2) | 0 | | 0 | | 1 (0,2) |
| Magdalena | 1 (0,2) | 0 | | 0 | | 1 (0,2) |

De los 146 casos de tuberculosis extrapulmonar, en 89 (61 %) no se informó el origen de la muestra. En 26 (17,8 %), la muestra provenía de la pleura, en 15 (10,3 %), de ganglios, en 7 (4,8 %), de órganos abdominales, en 8 (5,5 %), de la tráquea, y en 1 (0,7 %), del peritoneo.

El registro del resultado de la prueba de HIV solo se obtuvo en 147 (26 %) casos, de los cuales 2 (1,4 %) fueron positivos y 418 (73,9 %) no tenían esta información (cuadro 1). Los dos casos positivos eran formas pulmonares de pacientes con edades entre los 11 y 14 años.

En la distribución por entidad territorial de procedencia, se encontró que el mayor aporte provenía de las áreas del país que presentan más casos de

tuberculosis y farmacorresistencia; estas son Antioquia con 192 (34,0 %), Valle del Cauca con 109 (19,3 %) y Atlántico con 60 (10,6 %) (cuadro 1).

De los 565 casos analizados, 503 (89,0 %) eran nuevos. En este grupo, 455 (90,4 %) fueron sensibles a la isoniacida y la rifampicina ($IC_{95\%}$ 87,8-93,1), 26 (5,2 %) presentaron resistencia a la isoniacida ($IC_{95\%}$ 3,1-7,2), 2 (0,4 %) a la rifampicina ($IC_{95\%}$ 0,05-1,4), y 20 (3,9 %) fueron multirresistentes ($IC_{95\%}$ 2,2-5,8). En total, se identificaron 48 casos de resistencia, lo que corresponde a una resistencia global de 9,5 % ($IC_{95\%}$ 6,9-12,2), sin diferencias significativas entre los años estudiados (cuadro 2).

**Cuadro 2.** Vigilancia de la resistencia en casos nuevos y previamente tratados de tuberculosis en menores de 15 años, Colombia, 2010 a 2015

| Año | Casos | Casos nuevos | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Porcentaje de resistencia | | | | | | | | | |
| | | Sensible | p | H | p | R | p | MDR- TB | p | RG | p |
| 2010 | 72 | 62 (86,1 %) | REF | 7 (9,7 %) | REF | 0 | | 3 (4,2 %) | REF | 10 (13,9 %) | REF |
| 2011 | 61 | 55 (90,2 %) | 0,653 | 1 (1,6 %) | 0,112 | 0 | | 5 (8,2 %) | 0,543 | 6 (9,8 %) | 0,653 |
| 2012 | 90 | 82 (91,1 %) | 0,450 | 4 (4,4 %) | 0,311 | 0 | | 4 (4,4 %) | 0,762 | 8 (8,9 %) | 0,450 |
| 2013 | 90 | 83 (92,2 %) | 0,315 | 3 (3,3 %) | 0,176 | 1 (1,1 %) | REF | 3 (3,3 %) | 0,889 | 7 (7,8 %) | 0,315 |
| 2014 | 105 | 98 (93,3 %) | 0,179 | 4 (3,8 %) | 0,199 | 0 | | 3 (2,8 %) | 0,969 | 7 (6,7 %) | 0,179 |
| 2015 | 85 | 75 (88,2 %) | 0,874 | 7 (8,2 %) | 0,964 | 1 (1,2 %) | 0,502 | 2 (2,4 %) | 0,850 | 10 (11,8 %) | 0,874 |
| Total | 503 | 455 (90,4 %) 87,8-93,1 | 0,349 | 26 (5,2 %) 3,1-7,2 | 0,199 | 2 (0,4 %) 0,05-1,4 | 0,942 | 20 (3,9 %) 2,2-5,8 | 0,807 | 48 (9,5 %) 6,9-2,2 | 0,349 |
| | | Casos previamente tratados | | | | | | | | | |
| 2010 | 10 | 9 (90 %) | REF | 1 (10 %) | REF | 0 | | 0 | | 2 (20 %) | REF |
| 2011 | 22 | 19 (86,4 %) | 0,773 | 2 (9,1 %) | 0,567 | 0 | | 1 (4,5 %) | REF | 4 (18,2 %) | 0,714 |
| 2012 | 6 | 5 (88,3 %) | 0,696 | 1 (16,7 %) | 0,696 | 0 | | 0 | | 2 (33,3 %) | 1,000 |
| 2013 | 14 | 10 (71,4 %) | 0,552 | 2 (14,3 %) | 0,754 | 1 (7,1 %) | REF | 1 (7,1 %) | 0,678 | 4 (28,6 %) | 1,000 |
| 2014 | 5 | 4 (80 %) | 0,788 | 0 | | 1 (20 %) | 0,964 | 0 | | 1 (20 %) | 0,493 |
| 2015 | 5 | 3 (60 %) | 0,493 | 0 | | 1 (20 %) | 0,964 | 1 (20 %) | 0,806 | 2 (40 %) | 0,836 |
| Total | 62 | 50 (80,6 %) 70-91,3 | 0,786 | 6 (9,7 %) 1,5-17,8 | 0,587 | 3 (4,8 %) 1,0-13,5 | 0,753 | 3 (4,8 %) 1,0-13,5 | 0,598 | 12 (19,3 %) 8,7-29,9 | 0,702 |

H: isoniacida; R: rifampicina; MDR-TB: tuberculosis multirresistente ; RG: resistencia global; REF: grupo de comparación

Con antecedentes de tratamiento antituberculoso se encontraron 62 (10,9 %) casos. En este grupo, 50 (80,6 %) fueron sensibles a la isoniacida y a la rifampicina ($IC_{95\%}$ 70-91,3); 6 (9,7 %) presentaron resistencia a la isoniacida ($IC_{95\%}$ 1,5-17,8) y 3 (4,8 %) a la rifampicina ($IC_{95\%}$ 1,0-13,5), y hubo multirresistencia en 3 (4,8 %) ($IC_{95\%}$ 1,0-13,5). En total, se identificaron 12 casos de resistencia, lo que corresponde a una resistencia global de 19,3 % ($IC_{95\%}$ 8,7-29,9), sin diferencias significativas entre los años estudiados (cuadro 2).

De los 28 casos identificados con MDR-TB o resistencia a la rifampicina, 13 (46,4%) tenían resultado de prueba de sensibilidad a los fármacos antituberculosis de segunda línea. Once casos eran nuevos (39,3 %), de los cuales 9 (81,8 %) fueron sensibles a la kanamicina, la amikacina, la capreomicina y la ofloxacina, y 3 (18,2 %) presentaron resistencia: un niño de dos años de edad a la ofloxacina en Antioquia y otro de 5 años con XDR-TB a la kanamicina, la amikacina y la ofloxacina en el Valle del Cauca. Es decir, de los casos nuevos, uno (9,0 %) presentó resistencia a la kanamicina y la amikacina, y dos (18,2 %) a la ofloxacina, y en uno (9,0%) la tuberculosis era extremadamente resistente XDR-TB. Los dos casos (100 %) previamente tratados fueron sensibles a los cuatro fármacos de segunda línea evaluados.

## Discusión

El diagnóstico de tuberculosis y farmacorresistencia en la población infantil es un reto para los sistemas de salud debido a las limitaciones de los métodos diagnósticos por el laboratorio y a la inespecificidad de los síntomas en los niños, lo que favorece el subregistro y hace que no sea clara la magnitud de la enfermedad en ellos.

Algunos estudios indican que la confirmación bacteriológica se logra entre el 20 % y el 50 % de los que ingresan al programa de tuberculosis para tratamiento. Esto puede variar aún más si se tiene en cuenta la sensibilidad de las técnicas diagnósticas empleadas. En Colombia, generalmente son la baciloscopia y el cultivo, métodos con los cuales es difícil detectar la micobacteria debido a la escasa carga bacilar que tienen; además, la obtención de las muestras no es fácil y, en algunos casos, hay fallas en el proceso de recolección y procesamiento que pueden causar falsos negativos (1,10-13).

Otras posibles causas pueden ser las barreras que existen para acceder a las diferentes metodologías, sean convencionales, moleculares o mediante cultivo en medio líquido, las dos últimas con mayor sensibilidad; estos métodos diagnósticos fueron incluidos por el Ministerio de Salud en el plan obligatorio de salud y están disponibles en el país (14,15).

En el 2010, Llerena, *et al*., reportaron que el porcentaje de casos que contaron con un cultivo de *M. tuberculosis* y el resultado de la prueba de sensibilidad a los fármacos antituberculosis fue de 3,4 % en el 2007 y de 5,3 % en el 2008. Durante el periodo de estudio del presente trabajo, este porcentaje aumentó al 11,8 % en el 2010, se mantuvo estable hasta el 2014 y aumentó a 30,9 % en el 2015; esto se debe a que para este último año la notificación al Sivigila fue menor (3-9).

No hubo diferencias entre los sexos en lo referente a los casos de tuberculosis pediátrica, tal como se observa en los adultos y similar a lo descrito en otros estudios, en los cuales es claro que lo que sucede en los niños es un reflejo de lo que ocurre en los mayores de edad (4,10,16,17).

Los grupos etarios en los que predominó la tuberculosis infantil fueron de los de 0 a 5 y de 11 a 14 años, semejante a lo publicado por Llerena, *et al*., quienes observaron que el 62,4 % de los casos pertenecía a los mismos rangos de edad. Otros estudios consultados reportan algunas variaciones en los rangos, sin embargo, todos concuerdan en que existe un mayor riesgo de enfermar en las edades muy tempranas (menores de cinco), el cual disminuye en los niños entre los 6 y los 10 años, y aumenta de nuevo en los mayores de 11 años (4,11,16-20).

La presentación clínica más común es la tuberculosis pulmonar, aunque las formas miliares y extrapulmonares son más comunes que en los adultos y, por ello, siempre se debe mantener la sospecha diagnóstica. En el presente trabajo, el 70,6 % de los casos era de tuberculosis pulmonar, similar a lo reportado por otros autores (4,10,16,20-22).

En Colombia, el mayor porcentaje de los casos de tuberculosis extrapulmonar corresponde a la forma pleural, seguida por la meníngea y la ganglionar. En este estudio, no se encontraron casos de tuberculosis meníngea; predominaron la pleural y la ganglionar, semejante a lo reportado en el país. Es de resaltar el alto porcentaje de casos sin información sobre el origen de la muestra (3).

En este análisis, el porcentaje de coinfección con HIV fue de 1,4 % entre los casos en que se registró el resultado de la prueba. No se reportó esta condición en 74,0 % de los casos, semejante a lo encontrado en el estudio de Morcillo, *et al*., en el cual se presentó en el 1,6 % de los casos y no se conocía el dato en más del 70 %. Otros trabajos en Colombia indican una coinfección de alrededor del 6 %; sin embargo, esto puede variar según la incidencia de estas dos infecciones. Es evidente que existe un importante subregistro debido a la falta de información. La presencia conjunta de estas enfermedades aumenta el riesgo de diseminación, y las tasas de morbilidad y mortalidad (4,10,11,20,22).

En el año 2010, Llerena, *et al.,* reportaron que el 78,9 % de los casos nuevos eran sensibles a los fármacos antituberculosos, la resistencia global fue de 21,1 % y la MDR-TB de 6,5 %; en el presente trabajo, se evidenciaron menores porcentajes, de 9,5 % y 3,9 %, respectivamente. Esto se puede deber a que solo el 16,4 % de los casos notificados tenía pruebas de sensibilidad en el período estudiado, lo que indica un subregistro. Solo se estudiaron cinco casos previamente tratados, de los cuales uno (20 %) era de MDR-TB; en el presente análisis, la proporción fue de 4,8 %. Las diferencias se podrían deberse al número de casos evaluados con tratamiento previo en cada uno de los estudios.

En teoría, la presencia de resistencia en los menores de 15 años es el reflejo de la transmisión por un caso índice. Sin embargo, cuando ha habido una mala administración del tratamiento antituberculoso, aumenta la probabilidad de que se desarrolle una tuberculosis resistente (4,21).

Es de resaltar que los datos obtenidos no reflejan un aumento de la resistencia comparado con lo reportado previamente en el país (4,23).

Morcillo, *et al*., encontraron MDR-TB en 5,1 % de los casos nuevos y en 3,7 % de los previamente tratados, y ninguno de XDR-TB. En lo referente a la multirresistencia, los datos son similares a los aquí presentados. Sin embargo, en el presente trabajo se documenta la presencia de resistencia a los fármacos de segunda línea y el primer caso de XDR-TB en un menor de 15 años, el cual provenía del departamento del Valle del Cauca y falleció por esta causa (4,20).

Ante un caso de tuberculosis en un menor de edad, es fundamental garantizar la eficacia de los medicamentos administrados. La resistencia a la isoniacida, además de convertirse en un riesgo de falla terapéutica, hace necesario saber si el paciente recibió profilaxis contra la tuberculosis en algún momento de su vida. En estas circunstancias, es fundamental diferenciar entre la enfermedad latente y la activa. En una revisión sistemática de 2015 sobre la resistencia a la isoniacida, se estimó que el 12,1 % ($IC_{95\%}$ 9,8-14,8) de los niños con tuberculosis presentaría resistencia a este medicamento; algo que también se evidenció en el presente estudio en los casos nuevos y los previamente tratados (24).

Como limitaciones del presente estudio están los criterios de exclusión de los casos. Además, se presentó un alto porcentaje de registros sin información de la prueba de HIV en la base de datos utilizada, y no se pudo establecer si los casos previamente tratados correspondían a fracaso terapéutico, pérdida del seguimiento o recaída, ni los riesgos ni las características clínicas, bacteriológicas o epidemiológicas antes del diagnóstico, durante el tratamiento y en su condición final. Todo esto impidió hacer un estudio retrospectivo de cohorte.

Dada la relevancia de la información proporcionada por este estudio, que refleja la gran transmisibilidad de la enfermedad y las fallas de los programas de tuberculosis en todos los niveles de atención, es necesario practicar en estos casos pruebas más sensibles, como las moleculares, que permiten hacer un diagnóstico rápido y oportuno para prevenir formas graves de la enfermedad. Además, se debe mejorar la calidad del estudio de los contactos para detectar las fuentes de contagio y los casos nuevos, y fortalecer la vigilancia de la resistencia en los niños.

El Ministerio de Salud y Protección Social debe normar el uso de estas metodologías, para que a través de las empresas aseguradoras de planes de beneficios se garantice su uso, e incluirlas dentro de las rutas integrales de atención en salud (4,15,16).

**Agradecimientos**

A la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis del país, por las actividades de vigilancia de la resistencia realizadas.

**Referencias**

1. Jenkins H, Tolman A, Yuen C, Parr J, Keshavjee S, Pérez C, *et al*. Incidence of multidrug-resistant tuberculosis disease in children: Systematic review and global estimates. Lancet Infect Dis. 2014;383:1572-9. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60195-1
2. World Health Organization. Global tuberculosis report, 2016. Fecha de consulta: 4 de enero del 2017. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf
3. Instituto Nacional de Salud. Informe final del evento tuberculosis, Colombia, 2015. Fecha de consulta: 25 de febrero del 2016. Disponible en: http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Tuberculosis%202015.pdf
4. Llerena C, Fadul SE, Garzón MC, Mejía G. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos antituberculosos en menores de 15 años en Colombia. Biomédica. 2010;30:362-70. https://doi.org/10.7705/biomedica.v30i3.270.
5. Instituto Nacional de Salud. Comportamiento de la notificación de tuberculosis Colombia, semana 1-52 de 2010, período 13. Fecha de consulta: 25 de febrero de 2016. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe de Evento Epidemiolgico/Tuberculosis 2010.pdf
6. Instituto Nacional de Salud. Comportamiento de la notificación de tuberculosis Colombia, semana 1-52 de 2011, período 13, cierre. Fecha de consulta: 25 de febrero de 2016. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe de Evento Epidemiolgico/Tuberculosis 2011.pdf
7. Instituto Nacional de Salud. Informe del evento tuberculosis, hasta el periodo epidemiológico 13 del año 2012, cierre. Fecha de consulta: 25 de febrero de 2016. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe de Evento Epidemiolgico/TUBERCULOSIS 2012.pdf.
8. Instituto Nacional de Salud. Informe del evento tuberculosis, año 2013. Fecha de consulta: 25 de febrero de 2016. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe de Evento Epidemiolgico/TUBERCULOSIS 2013.pdf
9. Instituto Nacional de Salud. Informe final tuberculosis, Colombia, 2014. Fecha de consulta: 25 de febrero de 2016. Disponible en: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe de Evento Epidemiolgico/Tuberculosis 2014.pdf
10. Rodríguez E, Garrido M, Villarrubia S, Martpin L, Hernández G. Epidemiology of childhood tuberculosis in Spain: 2005-2009. Rev Esp Salud Pública. 2012;86:49-59.
11. Bisero E, Luque G, Borda M, Melillo K, Zapata A, Varela S. Tuberculosis en una población pediátrica atendida en un hospital público. Adherencia (sic) al tratamiento: Estudio descriptivo. Rev Amer Med Respiratoria. 2013;4:184-9.
12. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico de tuberculosis. Parte 1. Baciloscopia. Fecha de consulta: 18 de junio de 2016. Disponible en: http://www1.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-labs-baciloscopia.pdf

13. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico de tuberculosis. Parte 2. Cultivo. Fecha de consulta: 18 de junio de 2016. Disponible en: http://www1.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-labs-cultivo.pdf

14. Ministerio de Salud y Protección Social. Circular 058 de 2009. Fecha de consulta: 13 de junio de 2016. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/circular-058-2009.pdf

15. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 5975 de 2016. Fecha de consulta: 13 de junio de 2016. Disponible en: http://www.sispro.gov.co/recursosapp/SiteAssets/Resolucion-5975-de-2016-CUPS.pdf

16. Pérez T, Pérez L, Ghaddar N. Caracterización clínico-epidemiológica de la tuberculosis en la edad pediátrica. Santa Clara, Cuba: Universidad de Ciencias Médicas "Dr. Serafín Ruíz de Zárate Ruíz" de Villa Clara; 2013. Fecha de consulta: 8 de marzo de 2016. Disponible en: http://files.sld.cu/enfermeria-pediatria/files/2013/03/mencion-3-caracterizacion-clinico-epidemiologica-de-la-tuberculosis-en-la-edad-pediatrica-santa-clara-2009-2011.pdf

17. Dizdar S, Dzinovic A, Gojak R, Bakalovic G, Selimovic A. Descriptive review of the patients suffering from tuberculosis in the past 10 years treated at Pediatric Clinic of Clinical Center of Sarajevo University. Med Arch. 2014;68:317-8. https://doi.org/10.5455/medarh.2014.68.317-318

18. Haq S, Hussain M, Hrishin J, Abbasi S. Risk factors of tuberculosis in children. Ann Pak Inst Med Sci. 2010;6:50-4.

19. Arteaga A, Vélez E, Salazar O, Morales O, Cornejo J, Valencia D. Características clínicas y sociodemográficas de niños menores de 13 años con diagnóstico confirmado de tuberculosis pulmonar o sin él, en el Hospital Universitario San Vicente de Paúl, Medellín, Colombia, 2007-2008. Iatreia. 2010;23:227-39.

20. Morcillo N, Imperiale B, Corral J. Tuberculosis pediátrica, MDR-TB y XDR-TB en la provincia de Buenos Aires durante el período 2002-2007. Rev Am Med Resp. 2009;9:5-13.

21. Farga V, Caminero JA. Tuberculosis. Tercera edición. Santiago y Buenos Aires: Editorial Mediterráneo; 2010. p. 409.

22. Arenas N, García A, Coronado S, Beltrán C, Acosta S, Gómez J, *et al.* Prevalencia de tuberculosis infantil en Armenia, Colombia. Rev Salud Pública. 2010;12:1000-9.

23. Garzón M, Angée D, 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

24. Yuen CM, Jenkins HE, Rodríguez CA, Keshavjee S, Becerra MC. Global and regional burden of isoniazid-resistant tuberculosis. Pediatrics. 2015;136e50-9. https://doi.org/10.1542/peds.2015-0172

Biomédica 2019;39:339-53
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4427

Artículo original

# Tendencia de la mortalidad por suicidio en las áreas urbanas y rurales de Colombia, 1979-2014

Pablo Chaparro-Narváez, Diana Díaz-Jiménez, Carlos Castañeda-Orjuela

Observatorio Nacional de Salud, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** El suicidio es un grave problema social y de salud pública que afecta a la población de la mayoría de los países del mundo. Se han descrito diferencias en las tasas de suicidio entre las áreas rurales y las urbanas.
**Objetivo.** Estudiar la tendencia de las tasas de mortalidad por suicidio en Colombia en las áreas de defunción rural y urbana y según sexo, grupo de edad y método de suicidio para el periodo 1979-2014.
**Materiales y métodos.** Se realizó un estudio ecológico de tendencia temporal a partir de la información de mortalidad del Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Se calcularon las tasas de mortalidad específica y ajustada por edad y sexo. Las tendencias de las tasas por área para el periodo de estudio, y tanto por sexo y grupo de edad como por método de suicidio, se estudiaron mediante modelos negativos de regresión binomial y regresión de puntos de inflexión.
**Resultados.** Un total de 56.448 suicidios se registró en Colombia entre 1979 y 2014. El riesgo de suicidio fue más alto en el área urbana en hombres, en los grupos etarios de 25 a 44 años y de 65 y más años, y en quienes emplearon el ahorcamiento. El riesgo de suicidio fue mayor en el área rural para los hombres entre los 45 y los 64 años, y para aquellos que recurrieron al disparo de armas de fuego, armas cortantes, ahorcamiento y otros. La tendencia de las tasas en el área urbana mostró su máximo pico en 1999 y, en la rural, en el 2000; posteriormente, en ambas áreas se produjo un descenso paulatino. El ahorcamiento presentó una tendencia al ascenso en hombres en las dos áreas.
**Conclusión.** El suicidio ha mostrado una tendencia hacia la reducción después del año 2000, con diferencias entre las áreas urbanas y las rurales.

**Palabras clave:** suicidio; sexo; mortalidad; riesgo relativo; análisis de regresión; Colombia.

**The trend in mortality due to suicide in urban and rural areas of Colombia, 1979-2014**

**Introduction:** Suicide is a serious social and public health problem that affects the population in most countries in the world. Differences in suicide rates in rural and urban areas have been previously described**.**
**Objective:** To study the trend of mortality rates by suicide in Colombia, in rural and urban areas by gender, age group, and suicide method during the years 1979-2014.
**Materials and methods:** We conducted a temporal trend ecologic study using death certificates from the *Departamento Administrativo Nacional de Estadística*, DANE. Specific and adjusted by age and gender mortality rates were calculated. We estimated negative binomial and inflection point regression models to study the trends in mortality rates stratified by gender, age group, and suicide method.
**Results:** A total of 56,448 suicides was reported in Colombia between 1979 and 2014. The risk of suicide was higher in urban areas for men, individuals between 25 and 44 years, and 65 and over; and for those who used hanging as the suicide method. Also, the risk of suicide was higher in the rural area for men between 45 and 64 years old, and those who used firearms, sharp weapons, hanging, and others as suicide methods. The trend of suicide rates in urban areas showed its maximum peak in 1999 and in the rural ones in 2000. Then, in the two areas, there was a gradual decrease. Hanging in both areas presented a tendency to rise in men.
**Conclusions:** Suicide has shown a tendency toward reduction after the year 2000, with differences between urban and rural areas.

**Keywords:** Suicide; sex; mortality; relative risk (public health); regression analysis; Colombia.

El suicidio es un grave problema social y de salud pública que afecta a la población de la mayoría de los países del mundo. Es un fenómeno en el que intervienen múltiples dinámicas e influyen factores del contexto social, cultural, económico e individual (1). Su definición se hace compleja, pues existen variados conceptos según los distintos puntos de vista desde los cuales se puede examinar.

**Recibido:** 21/03/18
**Aceptado:** 26/09/18
**Publicado:** 26/09/18

**Citación:**
Chaparro-Narváez P, Díaz-Jiménez D, Castañeda-Orjuela C. Tendencia de la mortalidad por suicidio en las áreas urbanas y rurales de Colombia, 1979-2014. Biomédica. 2019;39:339-53.
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4427

**Correspondencia:**
Pablo Chaparro-Narváez, Observatorio Nacional de Salud, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N° 51-20, Bloque B, oficina 208, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 220 7700, extensión 1269
pchaparro@ins.gov.co

**Contribución de los autores:**
Todos los autores participaron en el diseño del estudio, el análisis estadístico, la discusión de resultados y la redacción del manuscrito.

**Financiación:**
Este trabajo fue realizado con recursos de funcionamiento del Observatorio Nacional de Salud del Instituto Nacional de Salud.

**Conflicto de intereses:**
Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

En el 2012 el suicidio fue la decimoquinta causa de muerte a nivel mundial, y afectó principalmente a los jóvenes y adultos de edad mediana (2). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que ocurrieron 788.000 muertes por suicidio en el mundo en el 2015, para una tasa anual mundial ajustada por edad de 10,7 por 100.000 habitantes (13,6 entre hombres y 7,8 entre mujeres). Para la región de las Américas, la tasa ajustada fue de 9,09 y, junto con la región del Mediterráneo Oriental exhibieron las tasas más bajas por regiones (3).

En Colombia la tasa ajustada fue de 6,2 suicidios por 100.000 habitantes en el 2000 (10,0 entre hombres y 2,7 entre mujeres), y pasó a una de 6,0 en el 2015 (10,1 entre hombres y 2,1 entre mujeres). Según el Observatorio Nacional de Salud, fue la vigesimoprimera causa de muerte (tasa=5,4; $IC_{95\%}$: 5,2-5,6) en 1998 y descendió al vigesimoquinto puesto entre las causas de muerte (tasa=4,3; $IC_{95\%}$ 4,1-4,5) en el 2011 (4).

Según el grado de urbanización, las tasas de suicidio presentan variaciones. Sin embargo, las nociones de áreas urbanas y rurales han sido conceptos que universalmente no se han unificado. En la revisión que Stack publicó en 1982, daba cuenta de las discrepancias que se presentaban en las tasas de suicidio entre las áreas urbanas y las rurales (5); desde entonces, distintos estudios han reportado variaciones y cambios en la tendencia de estas tasas entre dichas áreas (6-13), con resultados controvertidos. Mientras que en unos estudios se han señalado tasas más altas en las áreas rurales (14-16), otros las han reportado en las urbanas (17). En algunas investigaciones en que se consideró el grado de urbanización, se obtuvieron resultados diferentes según el sexo, el grupo de edad, el período de estudio (11,12,15,18-21) y el método de suicidio empleado (22-25).

En cuanto a los métodos de suicidio, estos difieren entre áreas y cambian con el tiempo. Uno de los principales métodos empleado en las áreas rurales ha sido la intoxicación con plaguicidas (26,27), mientras que en las urbanas, se recurre al salto desde un lugar elevado y a la inhalación de monóxido de carbono (28). Las variaciones se han atribuido a las relaciones entre la vida rural y los factores culturales, el aislamiento geográfico e interpersonal, las desigualdades económicas y sociopolíticas que probablemente adquieren su importancia en el momento de la toma de decisiones y, específicamente, las relacionadas con las estrategias para reducir el riesgo (6).

En varios estudios sobre mortalidad por suicidio en el país se han analizado diferentes aspectos desde distintas disciplinas, entre ellos, la tendencia, los factores de riesgo (29-39) y las inequidades (40). No obstante, son escasas las investigaciones que han analizado el suicidio desde el punto de vista de las áreas urbanas y rurales (41). El grado en que las tasas de suicidio varían en respuesta al grado de urbanización, no ha sido completamente investigado.

El objetivo del presente análisis fue evaluar la tendencia de las tasas de mortalidad por suicidio en Colombia en las áreas de defunción urbana y rural, y según sexo, grupo de edad y método de suicidio para el periodo de 1979 a 2014.

## Materiales y métodos

### *Diseño de estudio*

Se llevó a cabo un estudio ecológico de tendencia temporal para evaluar la tendencia de las tasas de mortalidad por suicidio en Colombia en las áreas

donde ocurrió la defunción (urbana o rural) entre 1979 y 2014, y según sexo, grupo de edad y método de suicidio.

### *Fuente de información*

Los datos de muerte por suicidio fueron obtenidos de los certificados individuales de defunción consolidados en las bases de mortalidad del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) (42). Se analizaron las muertes codificadas como suicidio de acuerdo con las normas de la Clasificación Internacional de Enfermedades, novena revisión (CIE-9) (E950-E959) para el periodo de 1979 a 1997 (43) y décima revisión (CIE-10) (X600-X849, Y870) para el periodo 1998-2014 (44). La información sobre la población para el periodo de 1979 a 2014 provino de las proyecciones de población del DANE (45).

### *Variables de estudio*

Las variables consideradas en el estudio fueron: año de registro de la defunción, número de muertes por año, sexo, edad, área donde ocurrió la defunción, método de suicidio y causa básica de defunción. En el certificado de defunción utilizado en el país, el área donde ocurrió la defunción del fallecido se clasifica en cabecera municipal, centro poblado o rural disperso. Para efectos del estudio, se reagruparon en urbana (cabecera municipal) y rural (centro poblado y rural disperso) (46).

Los diferentes métodos de suicidio se agruparon en ahorcamiento (E953, X70), disparo de arma de fuego y material explosivo (E955, X72-X75), envenenamiento (E950-E952, X60-X69), salto desde un lugar elevado (E957, X80), objeto cortante (E956, X78), ahogamiento (E954, X71) y otros mecanismos (E958-X959, X76-X77, X79, X81-X84, Y870).

### *Análisis estadístico*

Se calcularon las tasas de mortalidad crudas, las tasas ajustadas por edad y sexo según área, las tasas ajustadas por edad según sexo y área, las cuales se estratificaron por grupo de edad y método de suicidio, y las tasas específicas según sexo y área; las tasas se expresaron en muertes por 100.000 habitantes al año. Para el ajuste de las tasas de mortalidad por edad se empleó el método directo, utilizando como referencia la población nacional por grupos de edad quinquenal del censo del 2005.

Las tendencias de las tasas por área según sexo y grupo de edad, y según sexo y método de suicidio, se analizaron por medio de modelos negativos de regresión binomial (47). En la construcción de estos modelos de regresión, la variable independiente fue el año para la tasa total y, para los demás modelos de regresión, las variables explicativas fueron el año y el sexo. Se calculó la razón de prevalencia (RP) y su intervalo de confianza del 95 % ($IC_{95\%}$) junto con su valor de p.

La tendencia de las tasas de mortalidad por área según sexo, grupo de edad y método del suicidio, se determinó mediante el análisis de regresión de puntos de inflexión (*joinpoint* Poisson), procedimiento que empleó las tasas ajustadas por edad. Este análisis se utiliza para establecer el momento en que se producen cambios significativos en la tendencia, y estima la magnitud del aumento o la disminución observados en cada intervalo mediante el porcentaje de cambio anual.

El análisis comienza con una cantidad mínima de puntos de inflexión, y prueba si uno o más puntos son estadísticamente significativos y se deben agregar al modelo. El número de puntos se determina por medio de pruebas de permutación, cada una de las cuales tiene un nivel de significación asintótico correcto. Este nivel de significación se encuentra usando métodos de Montecarlo (48). El modelo final muestra los puntos de inflexión que mejor se adaptan cuando la tasa cambia significativamente.

En este análisis se calculó el porcentaje de cambio anual (PCA) y el porcentaje promedio de cambio anual. Con el primero, se caracterizaron las tendencias observadas de la siguiente forma: con PCA>0 y significación estadística se interpretó un aumento en la tendencia y con PCA<0 y significación estadística, una reducción; con un cambio menor o igual a 0,5 % anual (-0,5 ≤ PCA ≤ 0,5 %) y significación estadística, se interpretó como estable, y con un cambio mayor de 0,5 % anual (PCA < -0,5% o PCA >0,5 %) pero sin significación estadística, se juzgó sin cambios significativos (49).

Para el procesamiento de la información obtenida se emplearon hojas de cálculo de Microsoft Excel™. La información se analizó con los programas Stata™, versión 12, y Joinpoint Regression™ (50).

## Resultados

### *Tasas de suicidio*

Un total de 56.448 suicidios se registraron en Colombia entre 1979 y 2014. El 74,2 % (41.890) ocurrió en el área urbana (p<0,05). Las tasas promedio de mortalidad para el periodo fueron de 4,2 suicidios por 100.000 habitantes para el área urbana, y de 3,7 para el área rural.

Por sexo, la tasa promedio fue de 6,7 para los hombres del área urbana y de 5,9 para los del área rural; para las mujeres del área urbana, la tasa promedio fue de 1,8 y, para las del área rural, de 1,6.

Por grupos de edad, en los hombres las tasas fueron más altas en el grupo de 65 y más años y en el de 15 a 24 años, en tanto que en las mujeres las tasas más altas de evidenciaron en el grupo de 15 a 24 años.

Por método de suicidio, las tasas más altas en hombres fueron las de ahorcamiento (área urbana: 2,37; área rural: 1,65), seguidas por las de disparo de armas de fuego (área urbana: 2,25; área rural: 2,32); en las mujeres, fueron las de envenenamiento (área urbana: 0,95; área rural: 0,90), seguidas de las de ahorcamiento (área urbana: 0,42; área rural: 0,32).

### *Modelos de regresión*

El riesgo general de suicidio para los hombres de las áreas urbanas o rurales fue cuatro veces mayor con respecto a las mujeres. En el área urbana el riesgo de suicidio fue más alto en hombres de los grupos etarios de 25 a 44 años de edad y de 65 y más años, y para los que recurrieron al ahorcamiento. En el área rural el riesgo de suicidio fue más alto para hombres, para el grupo etario de 45 a 64 años de edad, y para los que recurrieron al ahogamiento, el disparo con armas de fuego y el uso de armas cortantes (cuadro 1).

El modelo negativo de regresión binomial para los datos anuales totales reveló una tendencia anual creciente en las tasas de suicidio durante el período de estudio (cuadro 1). Este modelo mostró que por sexo y grupos de

**Cuadro 1.** Suicidio: estadística descriptiva y regresión binomial negativa según el área en que ocurrió, Colombia, 1979-2014

| | Sexo | Área urbana | | | | | | Área rural | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | n | Tasa | RP | $IC_{95}$% | | p | n | Tasa | RP | $IC_{95}$% | | p |
| Total | | 41.890 | 4,2 | 1,02 | 1,02 | 1,03 | <0,001 | 13.989 | 3,7 | 1,02 | 1,02 | 1,03 | <0,001 |
| Total, por sexo | Masculino | 32.530 | 6,7 | 4,69 | 4,34 | 5,06 | <0,001 | 11.254 | 5,9 | 4,6 | 4,18 | 5,05 | <0,001 |
| | Femenino | 9.348 | 1,8 | | | | | 2.731 | 1,6 | | | | |
| Grupos de edad (años) | | | | | | | | | | | | | |
| 0 a 14 | Masculino | 708 | 0,5 | 0,98 | 0,19 | 5,20 | 0,98 | 283 | 0,4 | 1,25 | 0,21 | 7,52 | 0,81 |
| | Femenino | 706 | 0,5 | | | | | 215 | 0,3 | | | | |
| 15 a 24 | Masculino | 9.827 | 10,8 | 2,35 | 0,56 | 9,76 | 0,24 | 3.566 | 9,5 | 2,27 | 0,54 | 9,45 | 0,26 |
| | Femenino | 4.355 | 4,6 | | | | | 1.396 | 4,2 | | | | |
| 25 a 44 | Masculino | 12.887 | 9,4 | 5,00 | 1,45 | 17,22 | 0,01 | 4.210 | 8,6 | 4,92 | 1,38 | 17,50 | 0,01 |
| | Femenino | 2.860 | 1,9 | | | | | 772 | 1,8 | | | | |
| 45 a 64 | Masculino | 5.926 | 8,3 | 6,40 | 2,30 | 17,79 | <0,001 | 2.123 | 7,6 | 7,22 | 2,46 | 21,25 | <0,001 |
| | Femenino | 1.076 | 1,3 | | | | | 259 | 1,1 | | | | |
| 65 y más | Masculino | 3.182 | 12,8 | 11,96 | 4,77 | 29,99 | <0,001 | 1.072 | 9,1 | 11,00 | 3,85 | 31,46 | <0,001 |
| | Femenino | 351 | 1,1 | | | | | 89 | 0,8 | | | | |
| Métodos de suicidio | | | | | | | | | | | | | |
| Ahorcamiento | Masculino | 11.402 | 2,37 | 6,80 | 3,04 | 15,25 | <0,001 | 3.116 | 1,65 | 5,95 | 2,46 | 14,41 | <0,001 |
| | Femenino | 2.164 | 0,42 | | | | | 541 | 0,32 | | | | |
| Ahogamiento | Masculino | 224 | 0,05 | 4,10 | 1,15 | 14,68 | 0,03 | 233 | 0,12 | 5,95 | 2,46 | 14,41 | <0,001 |
| | Femenino | 66 | 0,01 | | | | | 86 | 0,05 | | | | |
| Saltar desde un lugar elevado | Masculino | 1.213 | 0,25 | 3,33 | 0,94 | 11,81 | 0,06 | 115 | 0,06 | 4,21 | 0,98 | 18,18 | 0,05 |
| | Femenino | 493 | 0,09 | | | | | 28 | 0,02 | | | | |
| Otros | Masculino | 811 | 0,17 | 3,16 | 1,00 | 9,99 | 0,05 | 382 | 0,2 | 4,19 | 1,47 | 11,91 | 0,01 |
| | Femenino | 322 | 0,06 | | | | | 87 | 0,05 | | | | |
| Envenenamiento | Masculino | 7.082 | 1,46 | 1,77 | 0,59 | 5,34 | 0,31 | 2.766 | 1,47 | 1,73 | 0,55 | 5,49 | 0,35 |
| | Femenino | 4.959 | 0,95 | | | | | 1.589 | 0,9 | | | | |
| Armas de fuego | Masculino | 10.970 | 2,25 | 11,80 | 3,58 | 38,93 | <0,001 | 4.425 | 2,32 | 12,18 | 3,61 | 41,06 | <0,001 |
| | Femenino | 1.215 | 0,23 | | | | | 382 | 0,22 | | | | |
| Armas cortantes | Masculino | 828 | 0,17 | 8,10 | 1,94 | 33,77 | <0,001 | 217 | 0,12 | 11,47 | 3,11 | 42,37 | <0,001 |
| | Femenino | 129 | 0,02 | | | | | 18 | 0,01 | | | | |

Fuente: Estadísticas vitales, DANE

n: número para cada estrato; RP: razón de prevalencia

edad, las tasas fueron mayores en el área rural, a excepción del grupo de 65 y más años; y según el método de suicidio, estas fueron mayores en el área urbana que en la rural (cuadro 2).

En el área urbana, el análisis de regresión de puntos de inflexión mostró su máximo pico en hombres en 1999; entre 1979 y 1999 hubo una tendencia significativamente creciente, seguida de un descenso significativo hasta el 2014; en el área rural el comportamiento fue similar, y el máximo pico se presentó en el 2000 (figura 1).

Para el periodo 1979-2014, por sexo y grupos de edad, el porcentaje promedio de cambio anual del análisis de regresión de puntos de inflexión indicó un aumento significativo del suicidio en hombres de los grupos de 5 a 14 años de edad del área urbana, de 0 a 14 años y de 65 y más años, en el área rural, así como un aumento significativo en mujeres de 45 a 64 años de edad del área urbana. El modelo presentó ajustes significativos en su tendencia en los distintos segmentos para cada uno de los grupos de edad, excepto para las mujeres del área urbana de 65 y más años (figura 1, cuadro 3).

**Cuadro 2.** Suicidio según área, regresión binomial negativa, Colombia, 1979-2014

| | Urbana | | | | Rural | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | RP | $IC_{95}$% | | p | RP | $IC_{95}$% | | p |
| Sexo | | | | | | | | |
| Femenino | 1,00 | | | | | | | |
| Masculino | 3,80 | 3,52 | 4,11 | <0,001 | 4,05 | 3,70 | 4,44 | <0,001 |
| Grupos de edad (años) | | | | | | | | |
| 0 a 14 | 1,00 | | | | | | | |
| 15 a 24 | 14,06 | 12,43 | 15,89 | <0,001 | 17,41 | 14,96 | 20,25 | <0,001 |
| 25 a 44 | 10,20 | 9,00 | 11,55 | <0,001 | 12,14 | 10,43 | 14,14 | <0,001 |
| 45 a 64 | 9,76 | 8,58 | 11,11 | <0,001 | 10,70 | 9,13 | 12,53 | <0,001 |
| 65 y más | 14,34 | 12,53 | 16,41 | <0,001 | 12,90 | 10,92 | 15,23 | <0,001 |
| Métodos de suicidio | | | | | | | | |
| Ahogamiento | 1,00 | | | | | | | |
| Ahorcamiento | 40,38 | 34,00 | 47,95 | <0,001 | 10,30 | 8,68 | 12,22 | <0,001 |
| Armas cortantes | 3,13 | 2,60 | 3,77 | <0,001 | 0,64 | 0,52 | 0,80 | <0,001 |
| Armas de fuego | 30,14 | 25,41 | 35,75 | <0,001 | 9,84 | 8,31 | 11,66 | <0,001 |
| Envenenamiento | 48,64 | 40,86 | 57,91 | <0,001 | 14,27 | 12,01 | 16,96 | <0,001 |
| Otros mecanismos | 4,10 | 3,42 | 4,93 | <0,001 | 1,34 | 1,10 | 1,63 | <0,001 |
| Saltar desde un lugar elevado | 5,93 | 4,95 | 7,09 | <0,001 | 0,40 | 0,31 | 0,51 | <0,001 |

Fuente: Estadísticas vitales, DANE

RP: razón de prevalencia

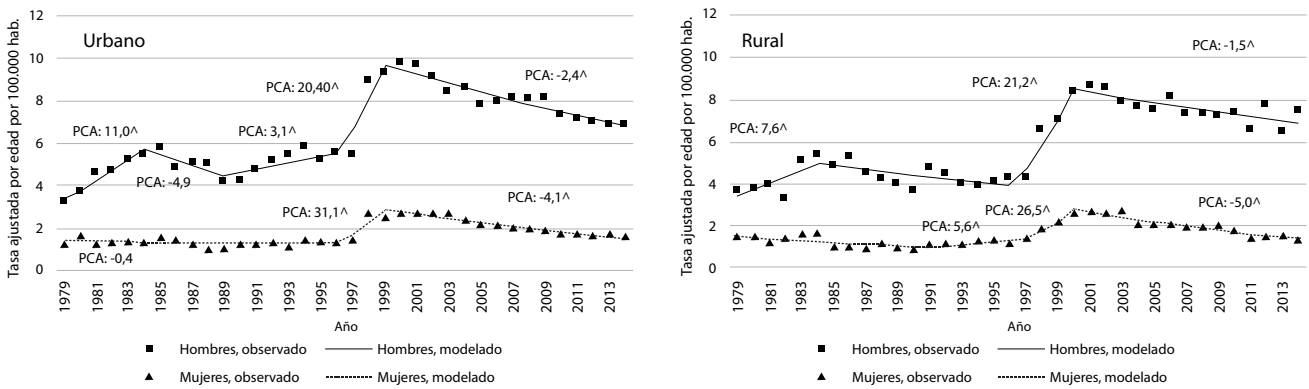



**Figura 1.** Tendencia de las tasas de mortalidad por suicidio ajustadas por edad, sexo y área, Colombia, 1979–2014

PCA: porcentaje de cambio anual

^ El PCA es significativamente distinto de 0 (p<0,05).

Fuente: Estadísticas vitales, DANE

Para todo el periodo de estudio en el área urbana, el porcentaje promedio de cambio anual del análisis de regresión de puntos de inflexión por método de suicidio indicó un aumento significativo del suicidio en hombres por ahorcamiento y ahogamiento, y en mujeres, por ahorcamiento y salto desde un lugar elevado; además, un descenso significativo en hombres por otros mecanismos y los no especificados, y en mujeres, por armas de fuego, otros mecanismos y los no especificados.

En el área rural se evidenció un aumento significativo del suicidio en hombres por ahorcamiento y ahogamiento, así como un descenso significativo en hombres por otros mecanismos, los no especificados y armas cortantes, y en mujeres, por armas de fuego. El modelo presentó ajustes significativos en la tendencia en los distintos segmentos para cada uno de los métodos de suicidio, excepto para las mujeres del área rural que recurrieron al ahorcamiento (figura 2, cuadro 4).

**Cuadro 3.** Tendencias de las tasas de suicidio por grupo de edad según área de defunción y sexo, y porcentaje de cambio anual de la mortalidad por suicidio, Colombia, 1979-2014

| Área urbana | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Hombres | | | | Mujeres | | | |
| Grupo de edad (años) | Periodo | PCA | Tendencia | PPCA | Periodo | PCA | Tendencia | PPCA |
| 0 a 14 | 1979-2008 | 6,0^ (4,7-7,4) | Aumento | 3,6^ (1,7 a 5,4) | 1979-1995 | -4,0^ (-7,4 a -0,5) | Reducción | 1,5 (-5,0 a 8,5) |
| | 2008-2014 | -7,4 (-15,3 a 1,2) | Sin cambios | | 1995-1998 | 70,6 (-22,2 a 274,0) | Sin cambios | |
| | | | | | 1998-2014 | -2,6^ (-4,6 a -0,6) | Reducción | |
| 15-24 | 1979-1996 | -0,4 (-0,8 a 1,6) | Sin cambios | 0,7 (-1,7 a 3,2) | 1979-1993 | -3,5^ (-5,8 a -1,2) | Reducción | -1,1 (-2,8 a 0,5) |
| | 1996-2000 | 21,8^ (6,5 a 39,3) | Aumento | | 1993-2001 | 14,6^ (8,5 a 21,1) | Aumento | |
| | 2000-2003 | -10,5 (-28,4 a 11,8) | Sin cambios | | 2001-2014 | -7,3^ (-9,1 a -5,5) | Reducción | |
| | 2003-2014 | -2,4^ (-4,0 a -0,8) | Reducción | | | | | |
| 25-44 | 1979-1996 | 1,1 (-0,1 a 2,4) | Sin cambios | 1,4 (-0,9 a 3,6) | 1979-1995 | -1,0 (-0,6 a 2,6) | Sin cambios | 1,0 (-1,9 a 3,9) |
| | 1996-1999 | 20,4 (-7,0 a 55,9) | Sin cambios | | 1995-1998 | 19,0 (-14,9 a 66,5) | Sin cambios | |
| | 1999-2014 | -1,8^ (-2,7 a -0,9) | Reducción | | 1998-2014 | -2,1^ (-3,1 a -1,1) | Reducción | |
| 45-64 | 1979-1985 | 13,8^ (6,1 a 22,1) | Aumento | 2,3 (-0,0 a 4,6) | 1979-2014 | 1,8^ (1,0 a 2,7) | Aumento | 1,8^ (1,0 a 2,7) |
| | 1985-1990 | -10,4 (-20,9 a 1,5) | Sin cambios | | | | | |
| | 1990-1999 | 10,1^ (6,2 a 14,2) | Aumento | | | | | |
| | 1999-2014 | -2,0^ (-3,0 a -1,1) | Reducción | | | | | |
| 65 y más | 1979-1996 | 3,0^ (1,0 a 5,0) | Aumento | 1,5 (-1,9 a 4,9) | 1979-2014 | 0,1 (-1,1 a 1,4) | Sin cambios | 0,1 (-1,1 a 1,4) |
| | 1996-1999 | 14,3 (-22,4 a 68,3) | Sin cambios | | | | | |
| | 1999-2014 | -2,5^ (-3,9 a -1,2) | Reducción | | | | | |
| Área rural | | | | | | | | |
| 0 a 14 | 1979-2014 | 4,5^ (3,1 a 5,8) | Aumento | 4,5^ (3,1 a 5,8) | 1979-1995 | -7,0^ (-12,6 a -1,1) | Reducción | 0,5 (-6,5 a 8,0) |
| | | | | | 1995-1999 | 62,9 (-9,7 a 193,8) | Sin cambios | |
| | | | | | 1999-2014 | -4,1^ (-7,8 a -0,2) | Reducción | |
| 15-24 | 1979-1996 | -0,1 (-2,2 a 2,1) | Sin cambios | 0,9 (-2,1 a 3,9) | 1979-1983 | 8,4 (-1,8 a 19,7) | Sin cambios | 0,2 (-2,4 a 2,8) |
| | 1996-2000 | 19,8 (-6,2 a 53,1) | Sin cambios | | 1983-1988 | -14,0^ (-21,5 a -5,7) | Reducción | |
| | 2000-2014 | -2,9^ (-4,7 a -1,0) | Reducción | | 1988-1997 | 6,1^ (2,7 a 9,7) | Aumento | |
| | | | | | 1997-2000 | 30,4^ (4,6 a 62,6) | Aumento | |
| | | | | | 2000-2014 | -5,8^ (-6,8 a -4,8) | Reducción | |
| 25-44 | 1979-1997 | 0,4 (-1,1 a 1,9) | Sin cambios | 1,4 (-1,5 a 4,3) | 1979-2003 | 3,7^ (2,1 a 5,3) | Aumento | 0,6 (-1,1 a 2,4) |
| | 1997-2000 | 23,2 (-11,4 a 71,3) | Sin cambios | | 2003-2014 | -5,8^ (-10,2 a -1,1) | Reducción | |
| | 2000-2014 | -1,5^ (-2,9 a -0,1) | Reducción | | | | | |
| 45-64 | 1979-1996 | -2,1^ (-3,7 a -0,4) | Reducción | 1,0 (-1,4 a 3,5) | 1979-1987 | -11,3 (-23,4 a 2,6) | Sin cambios | -0,2 (-3,6 a 3,5) |
| | 1996-2000 | 20,5 (-1,5 a 47,4) | Sin cambios | | 1987-2014 | 3,4^ (1,3 a 5,6) | Aumento | |
| | 2000-2014 | -0,2 (-1,6 a 1,2) | Sin cambios | | | | | |
| 65 y más | 1979-2014 | 2,3^ (1,5 a 3,1) | Aumento | 2,3^ (1,5 a 3,1) | | | | |

PCA: porcentaje de cambio anual; PPCA: porcentaje promedio de cambio anual
^ El PCA es significativamente distinto de 0 (p<0,05).
Fuente: Estadísticas vitales, DANE

## Discusión

### *Principales resultados*

En este estudio se encontraron diferencias significativas en las tasas de suicidio entre las áreas urbanas y las rurales según el sexo, el grupo de edad y el método empleado. Las tasas de suicidio en ambas áreas fueron más altas en hombres. Entre los hombres, las tasas fueron más altas en el área urbana, en tanto que entre las mujeres, las tasas por áreas fueron similares.

**Cuadro 4.** Tendencias de las tasas de mortalidad según los métodos de suicidio, el área de defunción y el sexo, Colombia, 1979-2014

| Características | Hombres | | | | Mujeres | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Periodo | PCA | Tendencia | PPCA | Periodo | PCA | Tendencia | PPCA |
| **Área urbana** | | | | | | | | |
| Ahorcamiento | 1979-1996 | 5,4^ (3,3 a 7,6) | Aumento | 5,5^ (2,2 a 9,1) | 1979-2004 | 9,2^ (7,5 a 10,9) | Aumento | 6,8^ (5,3 a 8,2) |
| | 1996-1999 | 25,8 (-13,7 a 83,4) | Sin cambios | | 2004-2014 | 0,9 (-2,0 a 3,9) | Sin cambios | |
| | 1999-2014 | 2,0^ (1,0 a 3,1) | Aumento | | | | | |
| Envenenamiento | 1979-1995 | 0,5 (-0,9 a 1,9) | Estable | | 1979-1992 | -4,3^ (-6,8 a -1,6) | Reducción | |
| | 1995-1999 | 23,7^ (8,5 a 41,0) | Aumento | 0,2 (-1,4 a 1,8) | 1992-2000 | 15,7^ (9,7 a 22,1) | Aumento | -1,2 (-2,9 a 0,4) |
| | 1999-2014 | -5,6^ (-6,6 a -4,6) | Reducción | | 2000-2014 | -7,2^ (-8,7 a -5,6) | Reducción | |
| Armas de fuego | 1979-1983 | 14,8^ (5,2 a 25,2) | Aumento | | 1979-2002 | 1,3^ (0,0 a 2,7) | Aumento | |
| | 1983-1996 | -1,8^ (-3,1 a -0,4) | Reducción | -0,5 (-2,0 a 1,0) | 2002-2014 | -12,0^ (-15,8 a -8,1) | Reducción | -3,5^ (-5,0 a -1,9) |
| | 1996-2000 | 13,9^ (3,3 a 25,5) | Aumento | | | | | |
| | 2000-2014 | -7,0^ (-7,9 a -6,1) | Reducción | | | | | |
| Saltar desde un lugar elevado | 1979-1985 | 19,4^ (4,5 a 36,5) | Aumento | 3,2 (-1,3 a 8,0) | 1979-2014 | 1,6^ (0,3 a 2,9) | Aumento | 1,6^ (0,3 a 2,9) |
| | 1985-1990 | -22,4 (-40,0 a 0,2) | Sin cambios | | | | | |
| | 1990-1999 | 19,7^ (11,6 a 28,4) | Reducción | | | | | |
| | 1999-2014 | -2,0^ (-3,5 a -0,4) | Reducción | | | | | |
| Otros mecanismos y los no especificados | 1979-1993 | 0,9 (-2,2 a 4,1) | Sin cambios | -2,6^ (-4,1 a -1,1) | 1979-2014 | -2,7^ (-4,1 a -1,4) | Reducción | -2,7^ (-4,1 a -1,4) |
| | 1993-2014 | -4,8^ (-6,5 a -3,2) | Reducción | | | | | |
| Armas cortantes | 1979-2014 | -0,2 (-1,0 a 0,7) | Sin cambios | | | | | |
| Ahogamiento | 1979-2014 | 1,6^ (0,1 a 3,0) | Aumento | | | | | |
| **Área rural** | | | | | | | | |
| Ahorcamiento | 1979-1996 | 1,0 (-0,9 a 3,0) | Sin cambios | | 1979-1995 | 1,6 (-2,7 a 6,1) | Sin cambios | |
| | 1996-1999 | 41,6 (-3,1 a 107,2) | Sin cambios | 5,2^ (1,8 a 8,7) | 1995-1999 | 28,3 (-13,7 a 90,8) | Sin cambios | 4,4 (-0,5 a 9,6) |
| | 1999-2014 | 3,8^ (2,8 a 4,9) | Aumento | | 1999-2014 | 1,8 (-0,5 a 4,2) | Sin cambios | |
| Envenenamiento | 1979-1996 | -1,2 (-3,2 a 0,9) | Sin cambios | | 1979-1990 | -6,6^ (-10,3 a -2,9) | Reducción | -1,5 (-3,2 a 0,3) |
| | 1996-2000 | 30,3^ (3,3 a 64,4) | Aumento | 0,4 (-2,4 a 3,2) | 1990-2002 | 11,8^ (8,4 a 15,3) | Aumento | |
| | 2000-2014 | -5,1^ (-6,8 a -3,3) | Reducción | | 2002-2014 | -8,8^ (-11,2 a -6,3) | Reducción | |
| Armas de fuego y explosivos | 1979-1983 | 16,2^ (2,5 a 31,8) | Aumento | | 1979-2002 | 0,5 (-1,3 a 2,3) | Estable | -2,1^ (-4,1 a -0,0) |
| | 1983-1997 | -1,7^ (-3,1 a -0,2) | Reducción | 1,2 (-1,4 a 3,9 | 2002-2014 | -6,8^ (-11,6 a -1,7) | Reducción | |
| | 1997-2000 | 20,3 (-7,3 a 56,1) | Sin cambios | | | | | |
| | 2000-2014 | -3,5^ (-4,7 a -2,4) | Reducción | | | | | |
| Saltar desde un lugar elevado | | | | | | | | |
| Otros mecanismos y los no especificados | 1979-1984 | 10,9 (-4,7 a 29,0) | Sin cambios | -3,2^ (-5,4 a -0,9) | | | | |
| | 1984-2014 | -5,4^ (-6,6 a -4,2) | Reducción | | | | | |
| Armas cortantes | 1979-2014 | -1,6^ (-2,8 a -0,4) | Reducción | -1,6^ (-2,8 a -0,4) | | | | |
| Ahogamiento | 1979-2014 | 1,9^ (0,4 a 3,4) | Aumento | 1,9^ (0,4 a 3,4) | | | | |

PCA: porcentaje de cambio anual; PPCA: porcentaje promedio de cambio anual
^ El PCA es significativamente distinto de 0 (p<0,05).
Fuente: Estadísticas vitales, DANE

En hombres y mujeres del área urbana se observó que las tasas presentaron una tendencia decreciente significativa, con un punto de inflexión en 1999. En hombres y mujeres del área rural se observaron patrones de cambio en las tasas similares a los del área urbana.

Según el método de suicidio empleado, en los hombres las tasas de ahorcamiento se incrementaron en las dos áreas, predominando las del área urbana; las tasas debidas a disparo de armas de fuego disminuyeron, especialmente en el área rural; las tasas de envenenamiento en el área

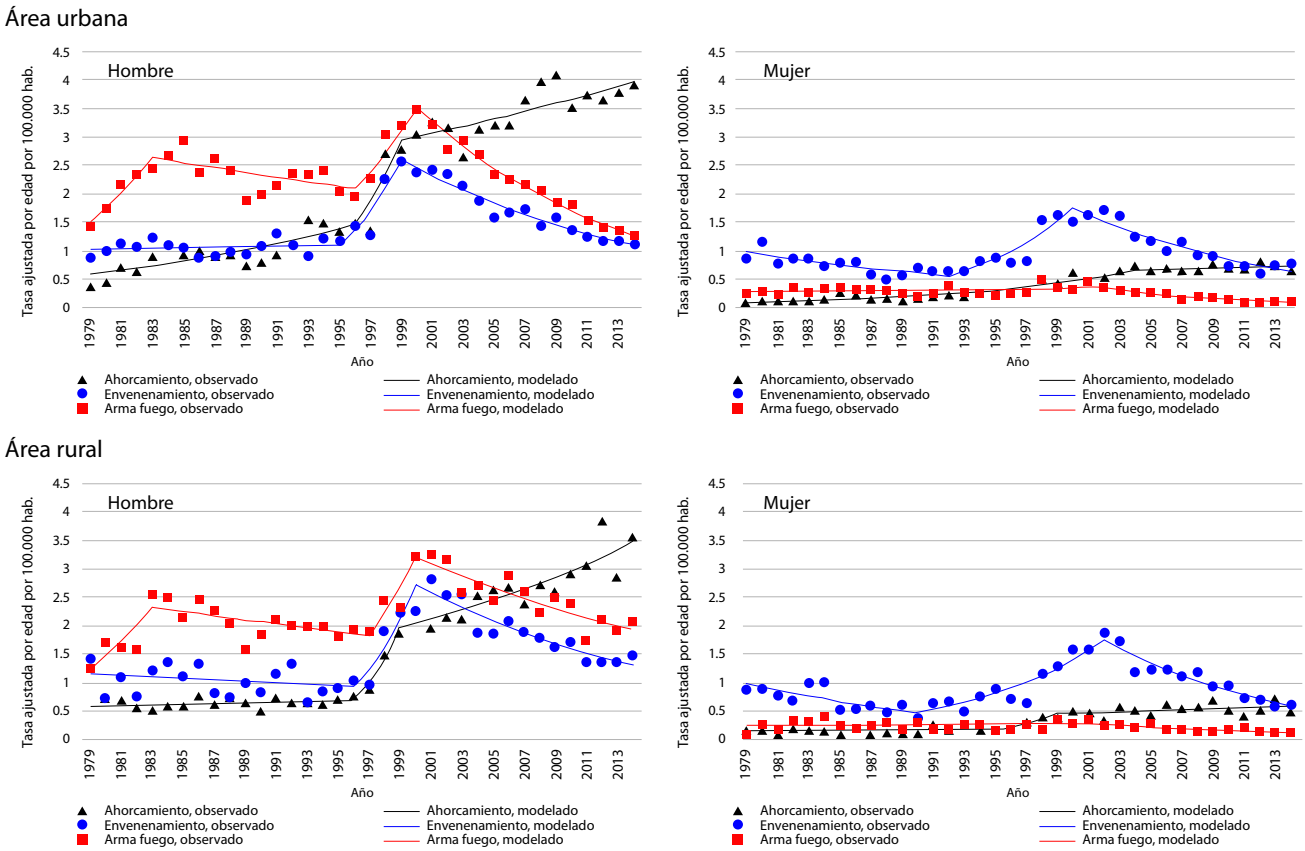



**Figura 2.** Tendencia de las tasas de mortalidad por suicidio ajustadas por edad, sexo y área, Colombia, 1979-2014

Fuente: Estadísticas vitales, DANE

urbana presentaron una disminución mayor. En las mujeres del área rural las tasas por ahorcamiento presentaron un mayor incremento, mientras que las tasas por envenenamiento fueron similares.

### *Comparación con otros estudios*

Al igual que lo encontrado en Corea (12), las tasas de suicidio para los hombres fueron tres veces mayores que para las mujeres, tanto en el área urbana como en el área rural. Asimismo, en muchos estudios en los que no se analizan las tasas de suicidio por áreas urbanas y rurales, se ha observado que las tasas son más altas en los hombres. Se ha indicado que esta situación puede estar relacionada con las dificultades económicas, las responsabilidades sociales, la elección de métodos más letales (51) y el abuso en el consumo de alcohol (52).

También, como en Corea (12), las tasas de suicidio aumentaron con la edad y la tasa del grupo de edad de 65 y más años fue diez veces más alta en las áreas urbanas que en las rurales. Se ha sugerido que el desempleo tiene una influencia positiva en los suicidios, y varía por grupos de edad y por sexo. Los hombres en edad productiva son particularmente sensibles (53); al reducir los ingresos y producir incertidumbre sobre los ingresos futuros, el desempleo aumenta la probabilidad de suicidio, efecto que es más fuerte en individuos de mediana edad (54). Entre los factores ligados al suicidio en los ancianos se han sugerido la depresión, el estado de salud (enfermedades

crónicas, hospitalizaciones repetidas), la familia (pérdida de seres queridos), y los sociales y ambientales (jubilación, pérdida de prestigio, rechazo de la sociedad, competencia con generaciones más jóvenes) (55).

De igual forma, las tasas de suicidio fueron mayores en las áreas urbanas como se ha reportado en los estudios del suroeste de Irán, entre 2004 y 2009 (17), y en Australia y Beijing, entre 1991 y 1996 (56).

En diversos estudios se han relacionado las variaciones en las tasas de suicidio con factores económicos, sociales, demográficos y culturales. En México, entre 1950 y 2008, el aumento de las tasas de suicidio de hombres jóvenes y ancianos fue atribuido a los cambios demográficos, las migraciones, el escaso acceso a la educación y la disminución del ingreso per cápita (57). En Australia se detectó un alto riesgo de suicidio en los grupos de las áreas geográficas que tenían condiciones socioeconómicas de nivel medio a bajo y altas tasas de desempleo (58,59).

Los cambios observados en las tasas de suicidios pueden obedecer a que los individuos con riesgo de suicidio y los que se suicidan son particularmente sensibles a los cambios sociales, económicos y culturales de la sociedad en la que viven (60,61). Por ejemplo, la teoría socio-ambiental de Durkheim predice altas tasas de suicidio en las sociedades con bajos niveles de integración social o regulación social (62), aunque se ha visto que las áreas con mayor privación tienen una menor tasa de suicidio (61). Por otra parte, cuando se consideran algunos indicadores sociales, económicos y demográficos del contexto, se encuentra que los suicidios varían según las condiciones sociales y económicas que primen en el momento.

En el caso de Colombia, el incremento de las tasas de suicidio entre 1979 y 1999-2000 puede deberse a que durante las últimas cinco décadas el país enfrentó una situación de violencia que se generó principalmente en las áreas rurales, donde aparecieron grupos armados al margen de la ley, cultivos ilícitos y narcotráfico, problemas que originaron el conflicto armado y la crisis económica, política y social. En la disputa por la tenencia de la tierra que se dio entre los distintos grupos que intervinieron, se presentaron extorsiones, cobro ilegal de impuestos, secuestros y expropiación de bienes que, finalmente, ocasionaron el desplazamiento de los habitantes del área rural (63). En 1979, el 36,1 % de la población habitaba el área rural y, en 2014, se redujo al 20,9 % (64). Por lo general, esta población ha sido pobre y con bajo nivel educativo y, por efecto del conflicto, se quedó sin tierra, sin oportunidades de empleo y sin medios de subsistencia (63). El desplazamiento forzoso, al que se aunó la migración masiva, produjo también consecuencias socioeconómicas en el sector urbano (63).

Entre 1999 y 2000, las tasas de suicidio mostraron tendencia a la reducción, como ocurrió en China entre 1987 y 2014, donde se observó que descendieron las tasas por sexo y por área en individuos de 65 y más años (65). Después del periodo 1999-2000 en el país se observó mejoría en algunos de los indicadores socioeconómicos que, en parte, podrían explicar el descenso de las tasas de suicidio. Entre el 2000 y el 2014, el producto interno bruto (PIB) aumentó el 44,7 %; el desempleo cayó de 15,5 %a 9,1 %; la inflación también descendió de 28,82 en 1979 a 3,66 en el 2014 (66).

Después de la crisis de 1999, el porcentaje de colombianos bajo la línea de pobreza disminuyó, de 50 % en el 2002 pasó a 28 % en el 2016. El porcentaje de pobres extremos bajó de 18 a 9 % en el mismo periodo. La pobreza

multidimensional cayó de 30 a 18 % entre el 2010 y el 2016 (67). En el 2005, el índice de pobreza multidimensional fue de 39 % en el área urbana y de 80 % en la rural (68). En el 2014, este índice fue de 15,4 % en las áreas urbanas y de 44,1 % en las rurales. La tasa de desempleo descendió paulatinamente, en el 2002 era de 15,52 % y en el 2014 se redujo a 9,38 % (66). Del mismo modo, el índice de fecundidad descendió, en 1979 fue de 4,07 y en el 2014 de 1,9 (69).

Por otra parte, en el comportamiento de las tasas de suicidio no se debe olvidar el papel que tienen los factores relacionados con la familia y con la salud mental, y que probablemente han incidido en las diferencias entre las áreas urbanas y las rurales. Los fenómenos migratorios pudieron originar la separación de las familias, de los amigos y de los compañeros de trabajo, hecho que al producir estrés y afectación mental entre los que se quedaron, los pudo llevar al suicidio. No obstante, entre los que se quedaron quizá mejoró la calidad de vida, siempre y cuando el entorno no fuera adverso, y de esta manera, las tasas de suicidio fueron menores (70).

Con respecto a la atención de la enfermedad mental de la población, se han tenido avances. Entre 1970 y 1989, la atención estaba dirigida al tratamiento farmacológico. A partir de 1993, las escasas acciones en salud mental estaban reducidas a la intervención de pacientes en crisis, y a unas pocas actividades de prevención con acceso y cobertura limitada. Para el 2007, se propusieron acciones orientadas a la promoción de la salud mental, a la prevención de la violencia, el maltrato, la drogadicción y el suicidio, y al tratamiento de los trastornos mentales de mayor prevalencia (71).

A pesar de estos adelantos, en la población no ha existido culturalmente la costumbre de consultar a los profesionales de salud mental, lo cual probablemente se deba al estigma que sufren las personas con enfermedad mental. Al estigmatizarlas, no solo se impide que las personas busquen ayuda, sino que se exponen a un mayor riesgo de suicidio, ya que este puede parecer la mejor solución para ellas. Además, el suicidio es una fuente de estigma, pues cualquier persona con ideación suicida se considera débil, vergonzosa y egoísta, lo que impide que busquen tratamiento temprano en el proceso suicida (72).

Asimismo, la presencia de cualquier trastorno mental, como los depresivos y de ansiedad, y los rasgos limítrofes de personalidad, están asociados con la ideación suicida grave (73). En este contexto, según la encuesta de salud mental, en 2015 el 7,0 % de los adultos que había pensado en suicidarse era del área urbana y el 5 % de la rural. De los adultos que tenían plan suicida, el 2,4 % era del área urbana. De los adultos que intentaron suicidarse, el 2,6 % era del área urbana y el 2,4 % de la rural (74). En cuanto al hogar urbano, se presentó diferencia en la ideación suicida, pues quienes refirieron no tener relación con el hogar urbano, tuvieron una mayor prevalencia en el grupo de ideación suicida (82,6 %) que los que sí la tuvieron (76,9 %) (73).

En lo concerniente a los métodos empleados para el suicidio, el envenenamiento fue más frecuente en el área rural y el ahorcamiento en la urbana. Esto es similar a lo encontrado en otros países, especialmente en aquellos en desarrollo, donde el envenenamiento es el método más común de suicidio en las zonas rurales (6,41).

En cuanto al método empleado para el suicidio, los hombres utilizan métodos más violentos, como las armas de fuego, el ahorcamiento, el salto desde lugares altos y el envenenamiento (por gas), mientras que las mujeres recurren a métodos menos agresivos, como el envenenamiento (sobredosis de

sustancias psicotrópicas o venenos) o las armas cortantes (75). La selección del método se basa en su disponibilidad. En las áreas rurales, prevalece el envenenamiento debido al fácil acceso a los plaguicidas empleados en agricultura y, en las áreas urbanas, se prefieren las armas de fuego (76).

Los resultados presentados deben interpretarse con precaución, pues este análisis tiene limitaciones. El estudio recurrió a las definiciones de área urbana y rural utilizadas en el país, las que pueden diferir de las empleadas en otros lugares. También, se debe considerar la calidad de la información en su cobertura y su contenido. Es probable que haya problemas de subregistro y mala clasificación de los casos de suicidio, debido a que en su certificación se involucran aspectos médicos y legales (2).

La tendencia presentada señala el comportamiento del suicidio en Colombia. El riesgo de suicidio fue diferente entre áreas urbanas y rurales. Los hombres tuvieron mayor riesgo de suicidio en las dos áreas. Se observaron diferencias por grupos de edad y por métodos de suicidio. La tendencia mostró variaciones temporales y según el sexo, el grupo de edad y el método empleado, pero, en general, mostró una reducción en las tasas de los últimos años. El conocimiento del comportamiento del suicidio por áreas permite identificar grupos de alto riesgo para orientar mejor la adopción de decisiones en torno a su prevención.

## Referencias


1. Neeleman J. Beyond risk theory: Suicidal behavior in its social and epidemiological context. Crisis. 2002;23:114-20. https://doi.org/10.1027//0227-5910.23.3.114
2. Organización Mundial de la Salud. Prevención del suicidio: un imperativo global. Prevencion del Suicidio. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2014. p. 92.
3. World Health Organization. Suicide rates (per 100 000 population) 2015. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2018. Disponible en: http://www.who.int/gho/mental_health/suicide_rates/en/
4. Instituto Nacional de Salud. Mortalidad 1998-2011 y situación de salud en los municipios de frontera terrestre en Colombia. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2013. p. 237.
5. Stack S. Suicide: A decade review of the sociological literature. Deviant Behav. 1982;4:41-66. https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2003.10.007
6. Hirsch JK. A review of the literature on rural suicide: Risk and protective factors, incidence, and prevention. Crisis. 2006;27:189-99. https://doi.org/10.1027/0227-5910.27.4.189
7. Phillips MR, Yang G, Zhang Y, Wang L, Ji H. Risk factors for suicide in China: A national case-control psychological autopsy study. Lancet. 2002;360:1728-36. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11681-3
8. Saunderson T, Haynes R, Langford IH. Urban-rural variations in suicides and undetermined deaths in England and Wales. J Public Health Med. 1998;20:261-7.
9. Morrell S, Taylor R, Slaytor E, Ford P. Urban and rural suicide differentials in migrants and the Australian-Born, New South Wales, Australia 1985-1994. Soc Sci Med. 1999;49:81-91. https://doi.org/10.1016/S0277-9536(99)00083-0
10. Dudley M, Kelk N, Florio T, Howard J, Waters B. Suicide among young Australians, 1964-1993: An interstate comparison of metropolitan and rural trends. Med J Aust. 1998;169:77-80.
11. Razvodovsky Y, Stickley A. Suicide in urban and rural regions of Belarus, 1990-2005. Public Health. 2009;123:27-31. https://doi.org/10.1016/j.puhe.2008.10.003
12. Cheong KS, Choi MH, Cho BM, Yoon TH, Kim CH, Kim YM, *et al*. Suicide rate differences by sex, age, and urbanicity, and related regional factors in Korea. J Prev Med Public Health. 2012;45:70-7. https://doi.org/10.3961/jpmph.2012.45.2.70
13. Ryu J. Regional differentials in age group specific suicide rate in South Korea 2005-2010. Korea J Popul Stud. 2008;31:21-44.
14. Patel V, Ramasundarahettige C, Vijayakumar L, Thakur JS, Gajalakshmi V, Gururaj G, *et al*. Suicide mortality in India: A nationally representative survey. Lancet. 2012;379:2343-51. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60606-0

15. Chen YY, Kwok CL, Yip PS, Wu KC. A test of the substitution hypothesis: An analysis of urban and rural trends in solid/liquid poisoning suicides in Taiwan. Soc Sci Med. 2013;96:45-51. https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2013.06.031

16. Zhang L, Li Z, Li X, Zhang J, Zheng L, Jiang C, *et al*. Study on the trend and disease burden of injury deaths in Chinese population, 2004-2010. PLoS One. 2014;9:2004-10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085319

17. Najafi F, Hasanzadeh J, Moradinazar M, Faramarzi H, Nematollahi A. An epidemiological survey of the suicide incidence trends in the Southwest Iran: 2004-2009. Int J Health Policy Manag. 2013;1:219-22. https://doi.org/10.15171/ijhpm.2013.40

18. Wilkinson D, Gunnell D. Youth suicide trends in Australian metropolitan and non-metropolitan areas, 1988-1997. Aust N Z J Psychiatry. 2000;34:822-8. https://doi.org/10.1080/j.1440-1614.2000.00812.x

19. Caldwell TM, Jorm AF, Dear KB. Suicide and mental health in rural, remote and metropolitan areas in Australia. Med J Aust. 2004;181(Suppl.7):10-4.

20. Dudley M, Kelk N, Florio T, Howard J, Waters B, Haski C, *et al*. Suicide among young rural Australians 1964-1993: A comparison with metropolitan trends. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol. 1997;32:251-60.

21. Cha ES, Khang YH, Lee WJ. Mortality from and incidence of pesticide poisoning in South Korea: Findings from national death and health utilization data between 2006 and 2010. PLoS One. 2014;9:e95299. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095299

22. Singh GK, Siahpush M. Increasing rural –urban gradients in US suicide. Am J Public Health. 2002;92:1161-7.

23. Pearce J, Barnett R, Jones I. Have urban/rural inequalities in suicide in New Zealand grown during the period 1980-2001? Soc Sci Med. 2007;65:1807-19. https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2007.05.044

24. Kapusta ND, Zorman A, Etzersdorfer E, Ponocny-Seliger E, Jandl-Jager E, Sonneck G. Rural-urban differences in Austrian suicides. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol. 2008;43:311-8. https://doi.org/10.1007/s00127-008-0317-1

25. Levin KA, Leyland AH. Urban/rural inequalities in suicide in Scotland, 1981-1999. Soc Sci Med. 2005;60:2877-90. https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2004.11.025

26. Eddleston M, Sudarshan K, Senthilkumaran M, Reginald K, Karalliedde L, Senarathna L, *et al*. Patterns of hospital transfer for self-poisoned patients in rural Sri Lanka: Implications for estimating the incidence of self-poisoning in the developing world. Bull World Health Organ. 2006;84:276-82.

27. Gunnell D, Eddleston M, Phillips MR, Konradsen F. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: Systematic review. BMC Public Health. 2007;7:357. https://doi.org/10.1186/1471-2458-7-357

28. Chang SS, Chen YY, Yip PS, Lee WJ, Hagihara A, Gunnell D. Regional changes in charcoal-burning suicide rates in East/Southeast Asia from 1995 to 2011: A time trend analysis. PLoS Med. 2014;11:e1001622. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001622

29. Tuesca R, Navarro E. Factores de riesgo asociados al suicidio e intento de suicidio. Salud Uninorte. 2003;17:19-28.

30. Franco SA, Gutiérrez ML, Sarmiento J, Cuspoca D, Tatis J, Castillejo A, *et al*. Suicidio en estudiantes universitarios en Bogotá, Colombia, 2004-2014. Cien Saude Colet. 2017;22:269-78. https://doi.org/10.1590/1413-81232017221.22452015

31. Cendales R, Vanegas C, Fierro M, Córdoba R, Olarte A. Tendencias del suicidio en Colombia, 1985-2002. Rev Panam Salud Pública. 2007;22:231-8.

32. Cardona D, Medina-Pérez A, Cardona D. Characterisation of suicide in Colombia. Rev Colomb Psiquiatr. 2016;45:170-7. https://doi.org/10.1016/j.rcp.2015.10.002

33. Gómez-Restrepo C, Rodríguez N, C. de Romero L, Pinilla C, López E, Díaz-Granados N, *et al*. Suicidio y lesiones autoinfligidas, Colombia, 1973-1996. Rev Colomb Psiquiatr. 2002;2:123-36.

34. Ortega PA, Manrique RD, Tovilla CA, López C, Cuartas JM. Clinical and epidemiological characteristics of suicides committed in Medellin, Colombia. Rev Colomb Psiquiatr. 2014;43:106-12. https://doi.org/10.1016/j.rcp.2014.02.006

35. Palacio-Acosta C, García-Valencia J, Diago-García J, Zapata C, Ortiz-Tobón J, López-Calle G, *et al*. Characteristics of people committing suicide in Medellín, Colombia. Rev Salud Pública (Bogotá). 2005;7:243-53.

36. Sánchez R, Orejarena S, Guzmán Y. Características de los suicidas en Bogotá: 1985-2000. Rev Salud Pública (Bogotá). 2004;6:217-34.

37. Torres L. ¿Existe una relación entre rendimiento académico y muerte por suicidio?: estudio retrospectivo en la Universidad de los Andes, 1992-2002. Bogotá: Universidad de los Andes; 2003. p. 48.

38. Dávila CA, Pardo AM, Pardo AM. Mortalidad por suicidios en Colombia y México: tendencias e impacto entre 2000 y 2013. Biomédica. 2016;36:415-22. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3224

39. Cardona D, Segura ÁM, Espinosa A, Segura A. Homicidios y suicidios en jóvenes de 15 a 24 años, Colombia, 1998-2008. Biomédica. 2013;33:574-86. https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i4.848

40. Campo-Arias A, Herazo E. Asociación entre desigualdad y tasa de suicidio en Colombia (1994-2013). Rev Colomb Psiquiatr. 2015;44:28-32.

41. García J, Montoya GJ, López CA, López MC, Montoya P, Arango JC, *et al*. Características de los suicidios de áreas rurales y urbanas de Antioquia, Colombia. Rev Colomb Psiquiatr. 2011;40:199-214. https://doi.org/10.1016/S0034-7450(14)60118-9

42. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Estadísticas vitales nacimientos y defunciones. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2018. Disponible en: http://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/salud/nacimientos-y-defunciones

43. Organización Panamericana de la Salud. Manual de la clasificación estadística internacional de enfermedades, traumatismos y causas de defunción. Novena revisión. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 1978.

44. Organización Panamericana de la Salud. Manual de la clasificación estadística internacional de enfermedades, traumatismos y causas de defunción. Décima revisión. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 1995.

45. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Series de población. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2018. Disponible en: https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/series-de-poblacion

46. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Conceptos básicos. Pagina oficial del DANE. 1994. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2018. Disponible en: http://www.dane.gov.co/files/inf_geo/4Ge_ConceptosBasicos.pdf

47. Agresti A. Categorical data analysis. Second edition. New Jersey: Wiley Series in Probability and Statistics; 2002. p. 710.

48. Kim HJ, Fay MP, Feuer EJ, Midthune DN. Permutation tests for joinpoint regression with applications to cancer rates. Stat Med. 2000;19:335-51.

49. National Cancer Institute. Methodology for characterizing trends. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2018. Disponible en: https://progressreport.cancer.gov/methodology

50. National Cancer Institute. Joinpoint trend analysis software, version 4.5.0.1. Fecha de consulta: 15 de junio de 2018. Disponible en: https://surveillance.cancer.gov/joinpoint/

51. Kanchan T, Menon A, Menezes RG. Methods of choice in completed suicides: Gender differences and review of literature. J Forensic Sci. 2009;54:938-42. https://doi.org/1 10.1111/j.1556-4029.2009.01054.x

52. Canetto SS, Sakinofsky I. The gender paradox in suicide. Suicide Life Threat Behav. 1998;28:1-23. https://doi.org/10.1111/j.1943-278X.1998.tb00622.x

53. Breuer C. Unemployment and suicide mortality: Evidence from regional panel data in Europe. Health Econ. 2015;24:936-50. https://doi.org/10.1002/hec.3073

54. Koo J, Cox WM. An economic interpretation of suicide cycles in Japan. Contemp Econ Policy. 2008;26:162-74. https://doi.org/10.1111/j.1465-7287.2007.00042.x

55. Pérez SA. Factores de riesgo suicida en el anciano. Cien Saude Colet. 2012;17:2011-6. https://doi.org/10.1590/S1413-81232012000800012

56. Yip PS, Callanan C, Yuen HP. Urban/rural and gender differentials in suicide rates: East and West. J Affect Disord. 2000;57:99-106. https://doi.org/10.1016/S0165-0327(99)00058-0

57. Hernández-Bringas H, Flores-Arenales R. El suicidio en México. Papeles de Población. 2011;17:69-101.

58. Qi X, Hu W, Page A, Tong S. Spatial clusters of suicide in Australia. BMC Psychiatry. 2012;12:86. https://doi.org/10.1186/1471-244X-12-86

59. Qi X, Hu W, Mengersen K, Tong S. Socio-environmental drivers and suicide in Australia: Bayesian spatial analysis. BMC Public Health. 2014;14:1-10. https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-681

60. Goldney RD, Schioldann JA, Dunn KI. Suicide research before Durkheim. Health History. 2018;10:73-93.

61. Milner A, Hjelmeland H, Arensman E, Leo D. Social-environmental factors and suicide mortality: A narrative review of over 200 articles. Sociol Mind. 2013;03:137-48. https://doi.org/10.4236/sm.2013.32021

62. Durkheim E. El suicidio. Madrid: Editorial Reus S. A.; 1928. p. 450.

63. Pérez E, Pérez M. El sector rural en Colombia y su crisis actual. Cuadernos de Desarrollo Rural. 2002;48:35-58.

64. Comisión Económica para América Latina y el Caribe, CEPAL. Estimaciones y proyecciones de población total, urbana y rural, y económicamente activa. Colombia. Estimaciones y proyecciones de población urbana y población rural según sexo y grupos quinquenales de edad. 2017. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2018. Disponible en: https://www.cepal.org/es/temas/proyecciones-demograficas/estimaciones-proyecciones-poblacion-total-urbana-rural-economicamente-activa

65. Zhong BL, Chiu HF, Conwell Y. Elderly suicide trends in the context of transforming China, 1987-2014. Sci Rep. 2016;6:37724. https://doi.org/10.1038/srep37724

66. Banco de la República. Información recopilada y calculada por el Departamento Técnico y de Información Económica del Banco de la República. Bogotá D.C.; 2018. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2018. Disponible en: http://web.sirhuila.gov.co/images/sirhuila/SIR_2018/BOLETINES/BANCO_DE_LA_REPUBLICA/Boletn-indicadores-econmicos-Banco-de-la-Repblica-23-de-abril-de-2018.pdf

67. DANE. Pobreza monetaria y multidimensional en Colombia 2016. Anexos [Internet]. Fecha de consulta: 26 de febrero de 2018. Disponible en: https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/pobreza-y-condiciones-de-vida/pobreza-y-desigualdad/pobreza-monetaria-y-multidimensional-en-colombia-2016

68. DANE. Indice de pobreza multimodal por municipio y departamento 2005 incidencias y privaciones. Bogotá; 2005. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2018. Disponible en: https://formularios.dane.gov.co/Anda_4_1/index.php/catalog/392

69. Expansion.com/Datosmacro.com. Colombia natalidad. Fecha de consulta: 26 de febrero de 2018. Disponible en: https://www.datosmacro.com/demografia/natalidad/colombia

70. Carcach C. A spatio-temporal analysis of suicide in El Salvador. BMC Public Health. 2017;17:339. https://doi.org/10.1186/s12889-017-4251-6

71. Comité de Políticas, Asociación Colombiana de Psiquiatría. Política Nacional del Campo de la Salud Mental. Documento-propuesta para discusión y acuerdos. Bogotá: Ministerio de la Protección Social; 2007.

72. Pompili M, Mancinelli I, Tatarelli R. Stigma as a cause of suicide. Br J Psychiatry. 2003;183:173-4. https://doi.org/10.1192/S0007125000162774

73. Arenas A, Gómez-Restrepo C, Rondón M. Factores asociados a la conducta suicida en Colombia. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud Mental 2015. Rev Colomb Psiquiatr. 2016;45(Supl.1):68-75.

74. Ministerio de Salud y Protección Social, Colciencias. Encuesta Nacional de Salud Mental, 2015. Bogotá: Minsalud; 2015. p. 1-242.

75. García de Jalon E, Peralta V. Suicidio y riesgo de suicidio. Ann Psychol Sis San Navarra. 2002;25:87-96

76. Cano-Montalbán I, Quevedo-Blasco R. Sociodemographic variables most associated with suicidal behaviour and suicide methods in Europe and America. A systematic review. European Journal of Psychology Applied to Legal Context. 2018;10:15-25. https://doi.org/10.5093/ejpalc2018a2

Biomédica 2019;39:354-69
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4403

Artículo original

# Malaria grave en mujeres gestantes hospitalizadas entre el 2010 y el 2014 en el departamento de Antioquia, Colombia

Alberto Tobón-Castaño, John Edison Betancur

Grupo de Malaria, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

**Introducción.** La malaria (o paludismo) durante la gestación impacta negativamente la salud de la madre y del neonato, con alto riesgo de complicaciones clínicas y mortalidad. En las regiones de alta endemia se han caracterizado, especialmente, la anemia materna y el bajo peso al nacer, pero es poco conocido el espectro clínico en las zonas de baja endemia.
**Objetivo.** Caracterizar clínica y epidemiológicamente los episodios de malaria en mujeres gestantes hospitalizadas en el departamento de Antioquia entre el 2010 y el 2014.
**Materiales y métodos.** Se hizo un estudio descriptivo, transversal y retrospectivo, con historias clínicas de mujeres gestantes con malaria por *Plasmodium falciparum* y *P. vivax.* Se utilizaron los criterios diagnósticos de malaria complicada de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Guía para la atención clínica integral del paciente con malaria vigente en Colombia.
**Resultados.** Se analizaron 111 casos; el 13,5 % se clasificó como complicación grave según los criterios de la OMS, porcentaje que ascendió a 23,4 % según los criterios de la guía colombiana. Las complicaciones detectadas fueron disfunción hepática, anemia, acidosis y trombocitopenia grave. No se observó diferencia en la frecuencia de las complicaciones según la especie de plasmodio. El 39,4 % de los casos presentó signos generales de peligro; la palidez y la ictericia fueron los más frecuentes. El 40,5 % presentó signos de peligro para la gestación como la cefalea persistente, el dolor abdominal y el sangrado vaginal.
**Conclusiones.** La malaria grave se presenta con gran frecuencia en las mujeres gestantes, sin diferencia según la especie de plasmodio, y se manifiesta con signos de peligro precozmente reconocibles. Se encontró un subregistro hospitalario del 88 % de los casos graves y falta de exámenes de laboratorio para un diagnóstico más completo. Se requiere un protocolo para el diagnóstico clínico de las mujeres gestantes con malaria.

**Palabras clave:** *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*; malaria; embarazo; Colombia.

**Severe malaria in pregnant women hospitalized between 2010 and 2014 in the Department of Antioquia (Colombia)**

**Introduction:** Malaria during pregnancy has a negative impact on maternal-neonatal health, with a high risk of clinic complications and mortality. High endemic areas are specially characterized by maternal anaemia and low birth weight. The clinical spectrum is little known in low endemic areas.
**Objective:** To clinically and epidemiologically characterize malaria episodes in hospitalized pregnant women in the Department of Antioquia (Colombia) in the period 2010-2014.
**Materials and methods:** Retrospective, cross-sectional, descriptive study with medical records of pregnant women with *P. falciparum* and *P. vivax* malaria. The WHO severe malaria diagnostic criteria and the Colombian *Guía para la atención clínica integral del paciente con malaria* (guidelines for comprehensive malaria treatment) were used.
**Results:** We analyzed 111 cases, out of which 13.5% were classified as severe malaria according to the WHO criteria. Following the Colombian Guidelines, the proportion increased to 23.4%. Identified complications included hepatic dysfunction, anaemia, acidosis, and severe thrombocytopenia. No difference in the frequency of complications by *Plasmodium* species was observed; 39.4% of the cases presented general danger signs, pallor and jaundice being the most frequent; 40.5% showed danger signs for pregnancy, such as persistent headache, abdominal pain, and vaginal bleeding.
**Conclusions:** Severe malaria is a highly frequent event in pregnant women, without differences by *Plasmodium* species. It shows early recognizable dangers signs. Hospital under-reporting was identified in 88% of severe cases as well as a lack of laboratory tests for a more comprehensive diagnosis. A protocol for the clinical diagnosis of pregnant women with malaria is required.

**Keywords:** *Plasmodium vivax*; *Plasmodium falciparum*; malaria; pregnancy; Colombia.

**Recibido:** 07/03/18
**Aceptado:** 07/10/18
**Publicado:** 09/10/18

**Citación:**
Tobón-Castaño A, Betancur JE. Malaria grave en mujeres gestantes hospitalizadas entre el 2010 y el 2014 en el departamento de Antioquia, Colombia. Biomédica. 2019;39:354-69.
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4403

**Correspondencia:**
Alberto Tobón-Castaño, Sede Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Calle 62 N° 52-59, laboratorio 610, Medellín, Colombia
Telefax: (574) 219 6487
alberto.tobon1@udea.edu.co

**Contribución de los autores:**
John Edison Betancur: recolección de datos
Ambos autores participaron en el diseño del estudio, el análisis de los datos y la escritura del manuscrito.

**Financiación:**
Colciencias, Gobierno de Colombia, Programa de Jóvenes Investigadores, Convocatoria 645 de 2014, que aportó los recursos para la participación de John Edison Betancur Romero, y Grupo de Malaria y Estrategia de sostenibilidad de la Vicerrectoría de Investigación 2015-2016, Universidad de Antioquia.

**Conflicto de intereses:**
Los autores declaramos no tener conflicto de intereses para la publicación de este manuscrito.

La malaria, o paludismo, es un reto vigente para la salud pública mundial y nacional. En el 2016 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en el mundo ocurrieron 216 millones de casos y 445.000 muertes; el 90 % de la carga mundial se ubica en el continente africano, en donde las mujeres embarazadas y los niños menores de cinco años aportan la mayor mortalidad (1).

Se calcula que 125 millones de embarazos ocurren anualmente en las regiones donde existe transmisión autóctona de *Plasmodium falciparum* y *P. vivax* (2). De estas mujeres gestantes, cada año cerca de 25 millones se encuentran expuestas a infecciones por malaria en áreas donde *P. vivax* es endémico (3). Los efectos de *P. falciparum* se han caracterizado en las áreas de alta transmisión, como África, en donde esta especie es responsable de una gran proporción de morbilidad y mortalidad materna y neonatal (4). A la malaria gestacional se le han atribuido del 3 al 15 % de los casos de anemia materna, del 8 al 14 % de los de bajo peso al nacer, y del 3 al 8 % de los de mortalidad infantil ocurridos en las zonas de alta endemia. Además, se la ha asociado con 75.000 a 200.000 muertes infantiles ocurridas anualmente en África, así como con una tasa de mortalidad perinatal de 25 a 80 por 1.000 nacidos vivos (5,6).

En las mujeres gestantes la presentación clínica del paludismo es diferente y más grave. En ellas, se ha estimado un riesgo tres veces mayor de complicaciones (3,7). En las zonas hiperendémicas y con transmisión estable, la adquisición de inmunidad en las etapas tempranas de la vida hace que muchas de estas infecciones cursen de forma asintomática durante el embarazo (8). Mientras tanto, en las zonas de endemia baja o media, o con transmisión inestable o estacional, son frecuentes las manifestaciones clínicas y se ha estimado una mayor probabilidad de complicaciones, como malaria cerebral, hipoglucemia, dificultad respiratoria y anemia hemolítica (7). En comparación con las regiones de África con alta endemia y prevalencia de *P. falciparum*, en las regiones endémicas de Latinoamérica, donde prevalecen las infecciones por *P. vivax*, poco se ha estudiado la expresión clínica de la malaria en mujeres embarazadas (9).

Entre los efectos más reconocidos de la malaria gestacional se incluyen el parto prematuro, el bajo peso al nacer y la anemia materna grave que, además, se han sido asociado con la presencia de *Plasmodium* spp. en la placenta (10). Los efectos de las infecciones por *P. vivax* en el embarazo y en el neonato se han estudiado poco, y el problema reviste especial importancia porque, en el caso de esta infección, las mujeres gestantes reciben esquemas de tratamiento parciales para evitar los efectos secundarios sobre el feto, lo que incrementa la probabilidad de recaídas con múltiples episodios durante el embarazo (9). Aunque con menor frecuencia que en las infecciones por *P. falciparum*, se ha informado enfermedad grave, parto prematuro, retardo del crecimiento intrauterino, abortos y mortinatos en aquellas producidas por *P. vivax* (10-12).

En Colombia un estudio prospectivo y descriptivo de 166 mujeres con diagnóstico de malaria durante el control prenatal reveló que 15 (9 %) de los casos estudiados se clasificaron como malaria grave según los criterios de la OMS (7), 10 (67 %) correspondieron a infecciones producidas por *P. vivax* y 5 (33 %), por *P. falciparum* (13).

La investigación sobre malaria gestacional en las zonas de baja endemia es escasa, sobre todo en los centros hospitalarios de mediana y alta complejidad; no se conocen las tasas de hospitalización, ni la letalidad, ni

las características clínicas de las mujeres gestantes con cuadros de gravedad. Esta información es fundamental para la comprensión de la enfermedad en las mujeres gestantes y para conocer la aplicabilidad en ellas de los criterios establecidos por la OMS para la malaria grave, con el fin de emplear protocolos de atención adaptados a las condiciones epidemiológicas de regiones de baja endemia y con transmisión inestable de malaria, como es el caso de Colombia.

El propósito de este estudio fue caracterizar clínica y epidemiológicamente los episodios de malaria en mujeres gestantes hospitalizadas en el departamento de Antioquia entre 2010 y 2014.

## Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio descriptivo de corte transversal y retrospectivo para caracterizar los episodios de malaria gestacional en el ámbito hospitalario. Esto se hizo en el departamento de Antioquia, segundo en Colombia en densidad poblacional (6.378.132 habitantes), donde se presentaron 9.277 casos de malaria (22,8 % de los 40.768 casos nacionales) en el 2014, con un índice parasitario anual (IPA) de 145,5 por 100.000 habitantes.

La información se recolectó en tres hospitales de tercer nivel de Medellín, los cuales sirven como centros de recepción de pacientes, y en los hospitales de segundo nivel en las tres subregiones que son endémicas para malaria: Urabá (1.538 casos; IPA=239,3), Bajo Cauca (5.578 casos; IPA=1.901,5) y Magdalena Medio (80 casos; IPA=70,2) (14).

Se revisaron los registros clínicos hospitalarios y los del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Sivigila) de las mujeres gestantes con diagnóstico de malaria durante el periodo de 2010 a 2014. La población de referencia estuvo constituida por las mujeres embarazadas atendidas en seis hospitales de referencia del departamento de Antioquia: Hospital Universitario San Vicente Fundación, Hospital Pablo Tobón Uribe y Hospital General de Medellín, en la capital; E.S.E. Hospital César Uribe Piedrahita, en el municipio de Caucasia; Hospital Antonio Roldán Betancur, en el municipio de Apartadó, y Hospital La Cruz E.S.E., en el municipio de Puerto Berrío.

Se incluyeron mujeres con cualquier edad gestacional, con gota gruesa positiva para cualquier especie de *Plasmodium* según los registros hospitalarios, y que hubieran estado hospitalizadas por lo menos durante 24 horas en alguno de los hospitales donde se desarrolló el estudio. Además, se buscaron las historias con diagnóstico de malaria según la CIE-10.

Para la recolección de los datos, se utilizó un cuestionario que permitió extraer información de la historia clínica de las mujeres gestantes sobre aspectos demográficos, clínicos (laboratorio, signos y síntomas) y epidemiológicos del diagnóstico, así como sobre el tratamiento y el seguimiento del episodio de malaria. Se emplearon los criterios clínicos de complicación de la OMS (15) y los de la 'Guía para la atención clínica integral del paciente con malaria' de Colombia (16). Los casos se clasificaron como: complicación grave, complicación moderada o sin complicaciones. Se determinó la presencia de signos de peligro, clínicos o parasitológicos, según los criterios propuestos por Tobón (17).

Los datos demográficos, clínicos y epidemiológicos se almacenaron en una base de datos en Microsoft Access™, y se procesaron mediante el paquete estadístico SPSS™, versión 24 para Windows, licenciados para la Universidad de Antioquia.

Se utilizó la estadística descriptiva para establecer las características demográficas, las características clínicas de la infección y los resultados de laboratorio clínico. Para las variables continuas, se calcularon la media, la mediana, la desviación estándar, los intervalos de confianza y el rango intercuartílico (según la distribución de los datos); para las variables cualitativas, se estimaron las frecuencias absolutas y los porcentajes. Se usaron la prueba t de Student, la U de Mann-Whitney y la de ji al cuadrado de Pearson para establecer las diferencias entre los resultados clínicos, los resultados de los exámenes de laboratorio, el tipo de infección, los signos de peligro y las complicaciones. Se estimó el *Odds Ratio* (OR) y su intervalo del confianza (IC) del 95 % para comparar proporciones entre las variables cualitativas.

### *Aspectos éticos*

Se respetaron las normas éticas internacionales para investigación biomédica con sujetos humanos establecidas por la OMS y las normas del Ministerio de Protección Social de Colombia (Resolución 8430 de 1993).

Para acceder a los registros clínicos, se obtuvo el aval del Comité de Ética del Hospital Universitario San Vicente Fundación (24 de junio de 2015), el del Hospital Pablo Tobón Uribe (Acta 14 de 2015) y el del Hospital General de Medellín (Acta 7 de 2015). Además, se contó con el aval de la dirección del E.S.E. Hospital César Uribe Piedrahita, la del Hospital Antonio Roldán Betancur y la del Hospital La Cruz E.S.E., y el del Instituto de Investigaciones Médicas de la Universidad de Antioquia.

## Resultados

### *Características sociodemográficas*

Se revisaron 389 historias clínicas hospitalarias de mujeres embarazadas con enfermedad febril y sospecha de malaria, de las cuales 111 cumplían el criterio de diagnóstico confirmado por gota gruesa durante la hospitalización (n=109), o cuyo diagnóstico se informó en la remisión (n=2). La mayoría [n=68, (61,3 %)] de las pacientes fueron atendidas en hospitales de tercer nivel de complejidad de Medellín, 26,1 % (n=29) en el municipio de Caucasia, 13, 5% (n=15), en Apartadó y, 5,4 % (n=6), en Puerto Berrío, en hospitales de segundo nivel.

La edad de las pacientes estuvo entre los 13 y los 43 años (media=22,7; desviación estándar, DE=6,01; mediana=21); el 57,8 % se encontraba entre los 13 y los 20 años. El grupo étnico se informó en 46 gestantes y en 61 % de ellas correspondía a mestizas. La residencia se conoció en 81 de ellas, de las cuales el 49 % residía en la zona rural. Del total estudiado (111), 97 (87 %) estaban afiliadas al Sistema General de Seguridad Social en Salud (SGSSS) y 86 (78 %) pertenecían al régimen subsidiado (cuadro 1).

### *Motivo de consulta*

El 46,8 % de las pacientes ingresó al servicio de urgencias, el 37,8 % fue remitido para hospitalización y el 15,3 % correspondió a hospitalizadas en el momento del diagnóstico. El promedio de evolución de la enfermedad actual fue de 4,3 días (DE=4,5). Los síntomas más frecuentes desde el inicio de la enfermedad fueron la fiebre (79,3 %) y la cefalea (67,6 %); la tríada de fiebre, cefalea y escalofríos se presentó en el 41% de casos. Estos y otros síntomas referidos desde el inicio de la enfermedad se presentan en la figura 1.

**Cuadro 1.** Características sociodemográficas en mujeres embarazadas con malaria en Antioquia según la condición clínica, 2010-2014

| Característica | Condición clínica de la malaria | | | | | | p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Total | | No complicada | | Complicada | | |
| | n=111 | (%) | n=85 | (%) | n=26 | (%) | |
| Edad: años / M (DE) | 23 (6) | | 23 (7) | | 23 (6) | | 0,845** |
| Edad: años / Me (RIC) | 21 (18-26) | | 21 (18-27) | | 21 (18-26) | | |
| Edad en años | | | | | | | |
| 0 a 22 | 63/109 | (57,8) | 48/83 | (57,8) | 15/26 | (57,7) | 0,99 |
| 23 a 50 | 46 | (42,2) | 35 | (42,2) | 11 | (42,3) | |
| Etnia | | | | | | | |
| Negra | 10/46 | (21,7) | 8/36 | (22,2) | 2/10 | (20,0) | 0,488 |
| Indígena | 8/46 | (17,4) | 5/36 | (13,9) | 3 /10 | (30,0) | |
| Mestiza | 28/46 | (60,9) | 23/36 | (63,9) | 5/10 | (50,0) | |
| Zona de residencia | | | | | | | |
| Urbana | 41/81 | (50,6) | 35/64 | (54,7) | 6/17 | (35,3) | 0,155 |
| Rural | 40/81 | (49,4) | 29/64 | (45,3) | 11/17 | (64,7) | |
| Afiliación en salud | | | | | | | |
| No | 14/111 | (12,6) | 13/85 | (15,3) | 1/26 | (3,8) | 0,124 |
| Sí | 97 | (87,4) | 72 | (84,7) | 25 /26 | (96,2) | |
| Tipo de afiliación | | | | | | | |
| Vinculado | 10/111 | (9,0) | 10/85 | (11,8) | 0/26 | (0,0) | 0,428 |
| Subsidiado | 86 | (77,5) | 64 | (75,3) | 22 | (84,6) | |
| Contributivo | 11 | (9,9) | 8 | (9,4) | 3 | (11,5) | |
| Ninguno | 3 | (2,7) | 2 | (2,4) | 1 | (3,8) | |
| Particular | 1 | (0,9) | 1 | (1,2) | 0 | (0,0) | |

M: media; Me: mediana; DE: desviación estándar; RIC: rango intercuartílico

* Prueba de ji al cuadrado de independencia; significación del 0,05

** Prueba U de Mann-Whitney; significación del 0,05

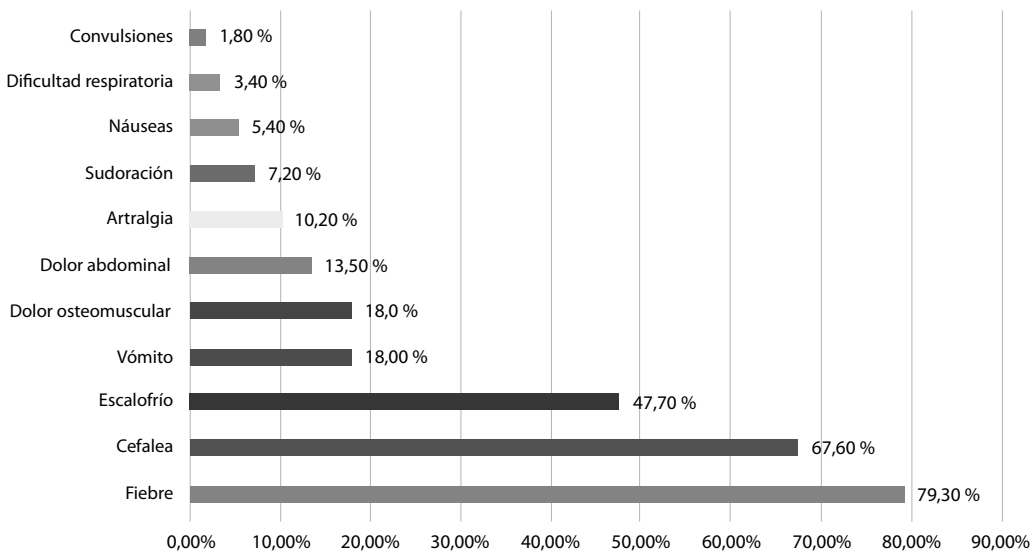



**Figura 1.** Síntomas en 111 mujeres gestantes con diagnóstico de malaria, Antioquia, 2010-2014

No hubo diferencias con respecto a la presencia de fiebre entre los casos de *P. vivax* (81,1 %) y los de *P. falciparum* (81,2 %) (p=0,994); lo mismo sucedió con la cefalea (69,4 *Vs*. 68,7 %) (p=0,418). Los valores de la mediana de los signos vitales al ingreso fueron: temperatura de 37,0 °C (rango intercuartílico, RIC=36,0-38,5), tensión arterial sistólica de 110 mm Hg (RIC=100-120), tensión diastólica de 68 mm Hg (RIC=60-72) y frecuencia respiratoria de 19 por minuto (RIC=18-20); el promedio del pulso fue de 88 latidos por minuto (desviación estándar, DE=18,3). No se encontraron diferencias en las medianas de los signos vitales según la especie parasitaria.

### *Antecedentes ginecoobstétricos, de enfermedad general y de malaria*

La edad gestacional al momento del diagnóstico de malaria se estableció en 108 mujeres embarazadas, y estuvo entre 6,4 y 39,6 semanas (media=27,2; DE=9,6; mediana=29,8). En 84 mujeres gestantes se estableció por ecografía y, en las restantes, según la fecha de la última menstruación. Según su valor, 14 (13 %) se encontraban en el primer trimestre de gestación, 24 (22 %) en el segundo y 70 (65 %) en el tercero.

En el momento del diagnóstico de malaria, las mujeres gestantes relataron haber asistido, en promedio, a 3,7 visitas de control prenatal (DE=2,1; rango=1-9; mediana=3,0). El 71,2 % reportó por lo menos un embarazo previo y, el 22,4 %, más de tres embarazos. El promedio de hijos nacidos vivos fue de 2,7 (DE=2,4) y el de abortos, de 1,2 (DE=0,7).

Solo en 24 casos se registraron los antecedentes de malaria antes de la gestación; 2 presentaron un episodio de malaria por *P. falciparum* y 22 por *P. vivax* (8 con un antecedente, 8 con dos antecedentes y 6 con más de dos). Diez mujeres gestantes habían presentado, al menos, un episodio de malaria por *P. vivax* en el último año.

### *Diagnóstico de malaria*

El diagnóstico registrado en la historia clínica según la CIE-10 (101 casos), se presenta en el cuadro 2, donde se contrasta con la clasificación basada en los resultados de laboratorio. Con el examen de gota gruesa se

**Cuadro 2.** Código de la CIE-10 en 101 de los 111 casos de malaria en gestantes y clasificación del estado clínico según los hallazgos de laboratorio*

| | **Casos complicados, según laboratorio clínico** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ***P. falciparum*** | ***P. vivax*** | **Mixta** | **Total** |
| B508 *P. falciparum* complicado | 1 | 0 | 0 | 1 |
| B518 *P. vivax* complicado | 0 | 2 | 0 | 2 |
| B519 *P. vivax* no complicado | 0 | 4 | 0 | 4 |
| B54 Paludismo no especificado | 4 | 13 | 1 | 18 |
| Total | 5 | 19 | 1 | 25 |
| | **Casos no complicados, según laboratorio clínico** | | | |
| | ***P. falciparum*** | ***P. vivax*** | **Mixta** | **Total** |
| B508 P. *falciparum* complicado | 0 | 1 | 0 | 1 |
| B509 *P. falciparum* no complicado | 2 | 2 | 1 | 5 |
| B518 *P. vivax* complicado | 0 | 1 | 0 | 1 |
| B519 *P. vivax* no complicado | 0 | 5 | 0 | 5 |
| B54 Paludismo no especificado | 6 | 53 | 2 | 61 |
| O98 Otras infecciones | 1 | 2 | 0 | 3 |
| Total | 9 | 64 | 3 | 76 |

* Un caso complicado y tres no complicados no tienen código CIE-10; los otros seis casos tienen código CIE-10, pero no se identificó la especie en la historia clínica.

diagnosticó la infección por *P. vivax* en 85 (77,0 %) mujeres gestantes, por *P. falciparum* en 16 (15,2 %) y la infección mixta por estas especies en 4 (3,8 %); en 6 no se informó la especie.

El recuento parasitario se informó en 52 (46,8 %) diagnósticos. Entre los casos de *P.* vivax, el promedio fue de 10.331 parásitos/µl (DE=14.685; mediana 5.800; RIC=2.480-14.000), el 67,4 % (29 de 43) con recuentos inferiores a 10.000 anillos/µl y un caso (2,4 %) por encima de los 50.000 parásitos/µl. Entre los casos de *P. falciparum*, el promedio del recuento fue de 8.455 anillos/µl (DE=7.665; mediana=4.675 anillos/µl; RIC=2.900-16.240) y ningún recuento fue superior a 20.000 parásitos/µl. El promedio del recuento en las infecciones mixtas fue de 3.467 parásitos/µl (DE=3.788; mediana=1.360; RIC=1.200-7.840) y todos fueron inferiores a 8.000.

### *Resultados de laboratorio*

En el cuadro 3 se presentan los resultados de los exámenes de laboratorio usados para clasificar las complicaciones clínicas y en el cuadro 4, los valores de referencia para la clasificación del estado de gravedad.

A 109 mujeres gestantes (cuadro 4) se les practicó hemograma durante el episodio de malaria y el promedio de la hemoglobina (Hb) fue de 10,2 g/dl (DE=1,9); 91 (83,5 %) mujeres gestantes presentaron algún grado de anemia (Hb<12 g/dl) y, 4 (3,6 %), anemia grave (Hb<7 g/dl); el menor valor de la hemoglobina fue de 3,6 g/dl, reportado en una mujer embarazada infectada con *P. vivax*.

El recuento de plaquetas se hizo en 102 casos, con una mediana de 156.500 plaquetas/µl (RIC=70.000- 220.000); 57 (55,8 %) mujeres embarazadas presentaron trombocitopenia (menos de 150.000 plaquetas/µl), en 13 (12,7 %) de ellas la trombocitopenia fue grave (menos de 50.000 plaquetas/µl). Solo se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las mujeres embarazadas infectadas con *P. vivax* y las mujeres infectadas por *P. falciparum* en los niveles de hemoglobina (10,3 *Vs*. 8,9 g/dl; p=0,004).

En 43 (38,7%) embarazadas se midió la creatinina, cuya mediana fue de 0,6 mg/dl (RIC=0,5-0,7); dos (4,6 %) tuvieron cifras por encima de 1 mg/dl. El nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) se midió en 21 casos; la mediana fue de 8,0 mg/dl (RIC=5,0-10,0) y solo una paciente (4,7 %) presentó un valor elevado (35,9 mg/dl). No se encontraron diferencias en estos marcadores según la especie de *Plasmodium*. La bilirrubina sérica total se midió en 42 mujeres

**Cuadro 3.** Resultados de laboratorio por especie de plasmodio en mujeres gestantes con malaria en Antioquia, 2010-2014

| Examen de laboratorio | *Plasmodium falciparum* (n=16) | | | *Plasmodium vivax* (n=85) | | | Infección mixta (n=4) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | Mediana | Q1/Q3 | n | Mediana | Q1/Q3 | n | Mediana | Q1/Q3 |
| Hemoglobina (M-DE) (g/dl) | 16 | 8,9 | 1,6 | 83 | 10,3 | 1,9 | 4 | 10,3 | 1,9 |
| Plaquetas (M-DE) (por $mm^3$) | 15 | 163.700 | 106.900 | 77 | 146.100 | 87.500 | 4 | 122.300 | 136.200 |
| Creatinina (mg/dl) | 7 | 0,6 | (0,5-0,9) | 29 | 0,6 | (0,5-0,6) | 2 | 0,6 | (0,5-0,6) |
| Nitrógeno ureico (M-DE) (mg/dl) | 6 | 11,1 | 12,9 | 11 | 7,6 | 3,5 | 1 | 10,0 | - |
| Bilirrubina total (mg/dl) | 10 | 0,9 | (0,7-15) | 27 | 1,0 | (0,8-1,8) | 2 | 1,6 | (1,5-17) |
| Bilirrubina directa (M-DE) (mg/dl) | 9 | 0,6 | 0,6 | 22 | 0,9 | 0,9 | 2 | 1,0 | 0,1 |
| Alanina aminotransferasa (UI/L) | 3 | 16,0 | (12,3-40,9) | 15 | 19,3 | (12,0-48,0) | 2 | 21,3 | (13,5-29,0) |
| Glucemia (g/dl) | 3 | 76,0 | (68,0-88,0) | 13 | 91,0 | (79,0-105,0) | 1 | 97,0 | - |
| Carga parasitaria (formas asexuales/microlitro) | 6 | 4.675 | (2.900-16.240 | 43 | 5.800 | (2.480-14.000) | 3 | 1.360 | (1.200-7.840) |

M: media; DE: desviación estándar; Q1/Q3: cuartiles 1 y 3

**Cuadro 4.** Clasificación de los resultados de laboratorio según el grado de alteración en mujeres gestantes con malaria en Antioquia, 2010-2014

| Examen de laboratorio | Grado de alteración | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Sin alteración | | Leve | | Moderada* | | Grave** | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Hemoglobina (g/dl) | 18 | 16,5 | 58 | 53,2 | 29 | 26,6 | 4 | 3,7 |
| Valor de referencia | >12 | | 9,1-12 | | 7-9 | | <7 | |
| Plaquetas (por mm3) | 45 | 44,1 | 41 | 40,2 | 13 | 12,7 | 3 | 2,9 |
| Valor de referencia | >150.000 | | 50.000-150.000 | | 25.000-50.000 | | <25.000 | |
| Bilirrubina total (mg/dl) | 21 | 50,0 | 9 | 21,4 | 6 | 14,3 | 6 | 14,3 |
| Valor de referencia | Hasta 1,0 | | 1,1-1,5 | | 1,6-3,0 | | >3,0 | |
| AST (UI/L) | 14 | 70,0 | 4 | 20,0 | - | - | 2 | 10,0 |
| Valor de referencia | 10-35 | | 36-80 | | 81-120 | | >120 | |
| ALT (UI/L) | 16 | 80,0 | 2 | 10.0 | - | - | 2 | 10,0 |
| Valor de referencia | 9-43 | | 44-80 | | 81-120 | | >120 | |
| Creatinina (mg/dl) | 41 | 95,3 | 2 | 4,6 | - | - | - | - |
| Valor de referencia | 0,5- 1,0 | | 1,1-1,5 | | 1,6-3,0 | | >3,0 | |
| Nitrógeno ureico (mg/dl) | 20 | 95,2 | 1 | 4,8 | - | - | - | - |
| Valor de referencia | 0 a 20 | | 21 a 40 | | 41 a 60 | | >60 | |

AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanino aminotransferasa

* Por encima de este rango se considera criterio de gravedad según la guía colombiana, excepto la hemoglobina, cuyo valor coincide con el de la OMS.

** Criterio de gravedad según la OMS

gestantes y la mediana fue de 1,02 mg/dl (RIC=0,74-1,67); la mediana de la bilirrubina directa entre 35 mujeres gestantes fue de 0,5 mg/dl (RIC=0,31-1,0). La bilirrubina total estaba elevada en 21 (50,0%) mujeres gestantes, de las cuales 6 (14,2 %) tenían más de 3,0 mg/dl. La bilirrubina directa se encontró elevada (más de 0,3 mg/dl) en 27 (77,1%) pacientes y, en 10 casos (28,6 %), estuvo por encima de 0,9 mg/dl (alteración grave: >0,8). De las tres mujeres gestantes con bilirrubina total mayor de 4 mg/dl, dos estaban infectadas por *P. vivax* (5,1 y 4,2 mg/dl) y una por *P. falciparum* (4,4 mg/dl). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas según la especie parasitaria.

La alanina aminotransferasa (ALT) en 20 casos presentó una mediana de 18,6 UI/L (RIC=12,9-38,0) y, en 4 (20 %) se presentaron valores por encima de 43 UI/L. En dos mujeres gestantes infectadas por *P. vivax*, su valor fue cinco veces superior al rango normal, de 228 y 294 UI/L, respectivamente. La aspartato aminotransferasa (AST) en 20 mujeres embarazadas presentó una mediana de 27,3 UI/L y 6 (30 %) presentaron más de 35 UI/L. Una paciente con *P. vivax* y otra con *P. falciparum* tuvieron cifras con criterio de gravedad: 349 y 127 UI/L, respectivamente.

La glucemia solo se cuantificó en 17 casos y su promedio fue de 93,1 mg/dl (RIC=76-101). Se diagnosticó hipoglucemia leve a moderada (rango=40-70 mg/dl) en 3 (17,6 %) y ninguna mujer gestante tuvo hipoglucemia grave (<40 mg/dl). No se presentaron diferencias estadísticamente significativas según la especie de plasmodio.

### *Malaria grave durante el embarazo*

En el cuadro 4 se clasifican cualitativamente los resultados de laboratorio según el grado de alteración, los cuales sirvieron para determinar si los casos eran complicados o no complicados; no se incluyeron el pH sanguíneo ni el bicarbonato plasmático, que solo se midieron en cinco pacientes muy graves.

En total, se detectaron 26 casos complicados, 15 con alteración grave y 11 con alteración moderada (cuadro 5). No hubo diagnóstico clínico de síndrome de dificultad respiratoria aguda ni de malaria cerebral.

En 15 (13,5 %) de los 111 casos analizados, hubo complicación grave según los criterios de la OMS (15). De estos, 10 (66,7 %) correspondieron a infecciones por *P. vivax* y 5 (33,3 %), por *P. falciparum*. Se presentó una sola complicación en 11 (73,3 %) casos y, más de una, en 4 (26,7 %). Las complicaciones diagnosticadas según los criterios de la OMS incluyeron:

- *disfunción hepática muy grave* en 7 (46,7 %) de los 15 casos, que representan el 6,3 % de todas las pacientes, 6 con aumento de la concentración de la bilirrubina sérica (entre 3,19 y 5,1 mg/dl), 2 con AST aumentada (127 y 349 UI/L) y 2 con ALT aumentada (228 y 294 UI/L);
- *acidosis* en 5 (33,3 %) de los 15 casos, 4 con aumento del bicarbonato plasmático mayor de 15 mmol/L y 1 con pH sanguíneo de menos de 7,35; solo uno de estos casos cumplió, además, un criterio clínico de alteración neurológica (convulsiones sin cuantificar), en el cual se presentó anemia y trombocitopenia moderadas, e hiperbilirrubinemia grave;
- *anemia grave* en 4 casos, con valores de hemoglobina entre 3,8 y 6,8 mg/dl, hematocrito entre 11 % y 21 %, y concentración de hemoglobina corpuscular media entre 29 y 33 pg;
- *trombocitopenia grave* en 3 casos, con recuento entre 9.300 y 23.400 plaquetas/µl.

Cuando se sumaron los criterios de lesión moderada y grave (16), consideradas como complicaciones, los casos ascendieron a 26 (23,4 %). De estos, 19 (73,1 %) fueron infecciones causadas por *P. vivax*, 6 (23,1 %), por *P. falciparum* y 1 (3,8 %) fue una infección mixta por estas especies. Se diagnosticaron complicaciones en 19 (22,3 %) de 85 casos de *P. vivax*, en 6 (37,5 %) de 16 casos de *P. falciparum* y en 1 (25 %) de 4 casos mixtos, sin que ello represente una diferencia estadísticamente significativa.

**Cuadro 5.** Complicaciones diagnosticadas y valores de laboratorio según el estado de gravedad en 111 mujeres gestantes con malaria en Antioquia

| Complicación | Examen de laboratorio | Sin complicación n=85 | | Complicación, guía colombiana[1] n=26 | | Complicación, guía de la OMS[2] n=15 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | n | Media/(DE)/mediana | n | Media/(DE)/mediana | n | Media/(DE)/mediana |
| Anemia[3] | Hemoglobina (g/dl) | 105 | 10,4 (1,8) 10,3 | 4 | 5,9 (1,4) 6,4 | 4 | 5,9 (1,4) 6,4 |
| Trombocitopenia | Recuento plaquetario (plaquetas/µl) | 86 | 179.291 (110.524) 66.000 | 13 | 37.877 (6.656) 39.000 | 3 | 16.133 (7.200) 16.000 |
| Hipoglucemia[4] | Glucosa (g/dl) | 15 | 96,6 (23,5) 91,0 | 0 | - | 0 | - |
| Disfunción renal[5] | Nitrógeno ureico (mg/dl) | 21 | 8,9 (7,1) 8,0 | 0 | - | 0 | - |
| | Creatinina (mg/dl) | 35 | 0,7(0,04) 0,6 | 0 | - | 0 | - |
| Disfunción hepática | Bilirrubina total (mg/dl) | 30 | 0,8 (0,3) 0,9 | 12 | 3,0 (1,4) 2,9 | 7 | 3,9 (1,2) 4,2 |
| | Bilirrubina directa (mg/dl) | 24 | 0,5 - (0,3) 0,4 | 11 | 1,6 (0,9) 1,1 | 7 | 2,0 (1,0) 1,9 |
| | Aspartato aminotransferasa (UI/L) | 14 | 26,7 (12,5) 23,6 | 6 | 102,2 (126,7) 41,5 | 5 | 118,0 (134,0) 48 |
| | Alanina aminotransferasa (UI/L) | 14 | 24,1 (16,7) 17,6 | 6 | 101,7 (125,6) 32,0 | 6 | 119,4 (131,8) 40,1 |

[1] Complicación grave, Colombia, incluye los pacientes con criterios de la OMS.
[2] Pacientes que solo cumplían los criterios de gravedad de la OMS.
[3] El criterio de anemia grave de la guía colombiana coincide con el de la guía actual de la OMS.
[4] Hipoglucemia leve en dos casos
[5] Disfunción renal leve en dos casos

La edad de las mujeres embarazadas no presentó diferencia entre los casos no complicados y los complicados (mediana=21 años, en ambos grupos). La edad gestacional en semanas establecida por ecografía, no presentó diferencia estadística (U de Mann-Whitney, p>0,05) entre los casos complicados (mediana=29,5) y los no complicados (mediana=30,2), y tampoco hubo diferencia significativa entre el número de controles prenatales realizados entre los casos complicados (mediana=3,0) y los no complicados (mediana=4,0) (U de Mann-Whitney, p>0,05). En 12 (38 %) de 32 primigestantes se presentó alguna complicación clínica, en comparación con 14 (18 %) de 79 multigestantes. De los 26 casos complicados, 12 (46,2 %) se presentaron en primigestantes (*Odds Ratio*, OR=2,8; IC: 1,1-7,0; p=0,029).

La proporción de casos complicados fue similar para cada trimestre de la gestación. De los 108 casos con edad gestacional calculada, hubo 3 (21,4 %) de 14 casos graves que se presentaron en el primer trimestre, 6 (25 %) de 18 en el segundo trimestre y 17 (24,3 %) de 70 casos en el tercer trimestre.

Entre las mujeres embarazadas con antecedente conocido de malaria, las que no presentaron complicación clínica tuvieron más episodios (mediana=2) que las complicadas (mediana=1), aunque sin diferencia estadísticamente significativa (U de Mann-Whitney, p>0,05).

***Signos de peligro***

Se encontró por lo menos un signo general de peligro en 44 (39,6 %) pacientes. La palidez, aunque no se describe en las historias clínicas como palidez intensa, se incluyó como signo de peligro y fue el más frecuente (n=17; 15,3 %), con distribución similar entre las mujeres gestantes con complicación y sin ella. Le siguió la ictericia (n=11; 10,2 %), que fue más frecuente en los siete casos complicados, con una diferencia significativa (OR=2,28; IC: 1,01-4,9; ji al cuadrado, p<0,003).

Otros signos menos frecuentes fueron: dolor en la región esplénica (n=1), dolor en la región hepática (n=2), convulsiones (n=2), delirio, letargia o somnolencia (n=4), tos (n=4), anuria u oliguria (n=5), vómito a repetición (n=7) e hiperpirexia (n=9). La presencia de alguno de estos signos se relacionó con una mayor probabilidad de complicación (OR=1,3; IC: 1,0-1,6; ji al cuadrado, p=0,028).

Se presentaron signos clínicos considerados de peligro para la gestación en 45 (40,5 %) pacientes; la cefalea persistente fue el más frecuente, seguido del dolor abdominal y el sangrado vaginal (cuadro 6). La presencia de por lo menos uno de estos signos se relacionó con mayores probabilidades de presentar una complicación clínica (OR=1,4; IC: 1,1-1,8; ji al cuadrado, p<0,003). Se reconoció la sintomatología indicativa de preeclampsia en 6 (5,4 %) de las pacientes, una de las cuales presentó disfunción hepática y trombocitopenia graves.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas de la cefalea ni del dolor abdominal según la especie de plasmodio.

***Resultados materno-neonatales***

Durante el episodio de malaria, 55 (49,5 %) mujeres gestantes dieron a luz. La proporción de bajo peso al nacer (<2.500 g) fue de 29,1 % (16 de 55), con un promedio de peso de los neonatos de 2.904 g (DE=581; mediana=3.020). Por su parte, en el 70,8 % de los nacimientos el parto fue

**Cuadro 6.** Signos de peligro para la gestación en 111 pacientes con malaria en Antioquia, 2010-2014

| Tipo de signo | n | % |
|---|---|---|
| Cefalea persistente | 29 | 26,1 |
| Dolor abdominal* | 10 | 9,0 |
| Sangrado vaginal | 9 | 8,1 |
| Dolor dorsal bajo | 7 | 6,3 |
| Mareos o desmayos | 5 | 4,5 |
| Dolor hipogástrico | 5 | 4,5 |
| Pérdida de líquido por vagina | 5 | 4,5 |
| Ausencia de movimiento fetal | 4 | 3,6 |
| Alteración visual** | 4 | 3,6 |
| Edema de manos o cara | 3 | 2,7 |
| Incremento de presión pélvica | 2 | 1,8 |

* No se describió como dolor abdominal persistente.

**Visión borrosa (n=3), fotopsias (n=1)

prematuro (<36 semanas), con un promedio de edad gestacional de 30 semanas (DE=8,8). El 32,1 % de los neonatos presentaron una talla inferior a 48 cm y el 33,3 % presentó un perímetro cefálico por debajo de los 33 cm. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los resultados neonatales, entre los casos complicados y los no complicados (cuadro 7).

**Cuadro 7.** Resultados materno-neonatales en 55 partos ocurridos durante el episodio de malaria por complicaciones según los criterios de la guía colombiana, Antioquia, 2010-2014

| Resultado | Total n=55 | | Malaria complicada n=7 | | Malaria no complicada n=48 | | p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | n (%) | $IC_{95\%}$ † | n (%) | $IC_{95\%}$ | n (%) | $IC_{95\%}$ † | |
| Peso al nacer | | | | | | | |
| Bajo <2.500 g | 16 (29,1) | 18,3 - 42,7 | 3 (42,9) | 12,5 - 79,6 | 13 (27,1) | 16,1 - 41,7 | 0,402* |
| Normal | 39 (70,9) | 57,2 - 81,6 | 4 (57,1) | 20,3 - 87,4 | 35 (72,9) | 58,2 - 83,8 | |
| Talla neonato | | | | | | | |
| Bajo <48 cm | 17 (32,1) | 20,6 - 46,1 | 3 (42,9) | 12,5 - 79,7 | 14 (30,4) | 18,5 - 45,5 | 0,667* |
| Normal | 36 (67,9) | 53,8 - 79,3 | 4 (57,1) | 20,2 - 87,4 | 32 (69,6) | 54,4 - 81,4 | |
| Perímetro cefálico | | | | | | | |
| Bajo <33 cm | 13 (33,3) | 19,9 - 50,0 | 2 (50,0) | 8,8 - 91,1 | 11 (31,4) | 17,8 - 49,1 | 0,589* |
| Normal | 26 (66,7) | 49,9 - 80,0 | 2 (50,0) | 8,8 - 91,1 | 24 (68,6) | 50,8 - 82,1 | |
| Edad gestacional | | | | | | | |
| Bajo < 36 semanas | 34 (70,8) | 56,0 - 82,2 | 5 (71,4) | 28,8 - 93,9 | 29 (70,7) | 54,5 - 82,9 | 0,673* |
| Normal | 14 (29,2) | 17,7 - 43,9 | 2 (28,6) | 6,0 - 71,1 | 12 (29,3) | 17,0 - 45,4 | |
| Apgar 1 | | | | | | | |
| Bajo <7 | 1 (2,1) | 0,2 - 14,5 | 1 (16,7) | 1,7 - 69,1 | 0 | - | 0,128* |
| Normal | 46 (97,9) | 85,4 - 99,7 | 5 (83,3) | 30,8 - 98,2 | 41 (100) | - | |
| Peso de neonato en gramos (M ± DE) | 2.858 (671) | 2.678-3.037 | 2.522 (646) | 1.925-3.120 | 2.959 (556) | 2.714-3.097 | [1]0,063† |
| Talla en cm (Me ± RIC) | 48 (47-49) | - | 48 (47-49) | - | 48 (43-49) | - | 0,431** |
| Perímetro cefálico (M ± DE) | 39,2 (19,4) | 33,2 - 45,2 | 45,8 (29,8) | 8,7 - 82,8 | 38,3 (18,1) | 32,4 - 44,3 | 0,784† |
| Edad gestacional parto (M ± DE) | 30 (8,8) | 27,5 - 32,6 | 30,4 (9,3) | 21,7 - 39,1 | 30,0 (8,8) | 27,2 - 32,8 | 0,91 |
| Apgar 1 (Me ± RIC) | 9 (8-9) | - | 9 (8-9) | - | 8,5 (8-9) | - | 0,652** |

M: media; Me: mediana; DE: desviación estándar; RIC: rango intercuartílico

* Prueba de ji al cuadrado de independencia. Significación del 0,05

** Prueba U de Mann-Whitney. Significación del 0,05

† Prueba t de Student. Significación del 0,05

## Discusión

La malaria es un problema importante de salud pública, especialmente en las mujeres gestantes, debido a su asociación con efectos adversos maternos y neonatales.

El cuadro clínico característico de la malaria corresponde a un síndrome febril precedido de escalofríos, el cual se acompaña de síntomas inespecíficos como cefalea, dolor osteomuscular generalizado y debilidad. La progresión a malaria grave está condicionada por diversos factores del parásito y del huésped, y se caracteriza por una falla multisistémica cuyas principales complicaciones incluyen malaria cerebral, edema pulmonar, falla renal aguda, anemia grave, acidosis metabólica e hipoglucemia (7).

Las mujeres gestantes representan un importante grupo de riesgo por tener mayor propensión a adquirir la infección y desarrollar malaria complicada. Las consecuencias de la malaria gestacional más informadas incluyen infección placentaria, anemia materna, bajo peso al nacimiento, parto prematuro, infección congénita e incremento en la mortalidad materno-neonatal (4,5,18).

En este estudio se diagnosticó malaria grave en 23,4 % de las mujeres gestantes estudiadas, y el 13,5 % cumplió con los criterios de gravedad de la OMS. Las complicaciones más frecuentes fueron disfunción hepática, anemia grave, acidosis y trombocitopenia grave. Dos pacientes presentaron convulsiones durante la hospitalización. Sin embargo, no se consideraron como casos de malaria cerebral porque no se conoció la frecuencia de estos episodios; una de ellas presentó disfunción hepática grave y acidosis, y la otra, trombocitopenia grave.

En un estudio previo (14), de 166 mujeres gestantes de Colombia, el 9 % cumplía los criterios de gravedad de la OMS, que incluían disfunción hepática (5,4 %), anemia grave (2 %), hemoglobinuria y disfunción renal (menos del 1 %).

Debe tenerse presente que la gran frecuencia de complicaciones encontrada en este estudio no refleja la prevalencia de malaria grave durante la gestación, dado que el estudio fue de base hospitalaria en el segundo y el tercer nivel de atención, dejando por fuera los casos atendidos en el primer nivel, que son los casos agudos. De otro lado, dado que en Colombia deben remitirse los casos graves desde el primer nivel, los casos estudiados sí dan cuenta de la presentación clínica y su frecuencia.

En este estudio, la mayoría de las mujeres embarazadas con malaria eran de etnia mestiza, menores de 20 años, multigestantes, y presentaron la malaria durante el tercer trimestre de gestación. Las primigestantes tuvieron una mayor probabilidad de presentar malaria grave que las multigestantes. La edad no difirió entre las pacientes que presentaron alguna complicación y las que no lo hicieron (U de Mann-Whitney, $p>0,05$). Estos resultados coinciden con los de un estudio en Honduras (19), en el cual se encontró que el 82 % de la mujeres embarazadas eran adolescentes (15 a 29 años) y que el 68 % de los casos analizados de malaria en el embarazo ocurrieron durante el tercer trimestre de gestación. Resultados en la misma dirección también fueron reportados en una cohorte de mujeres gestantes de la región de Urabá en Colombia (13).

La asistencia regular al programa de control prenatal, con tres o más visitas en la mitad de casos, puede relacionarse con la detección oportuna de la malaria. Aunque el número de controles en los casos complicados no fue

inferior al de los no complicados, la evolución hacia un cuadro clínico grave podría explicarse, en parte, porque muchas infecciones tienen baja carga parasitaria y no pueden detectarse con la gota gruesa, que es el método diagnóstico de rutina. Esto permite que la infección progrese y cause un daño crónico, de manera que podría facilitarse la aparición de complicaciones (20). En el noroeste de Colombia, en un estudio con 180 mujeres gestantes, se estableció que las infecciones mixtas submicroscópicas por *P. vivax* y *P. falciparum* se asociaron con bajo peso al nacer y prematuridad (21).

La capacidad de las diferentes técnicas microscópicas para permitir una correcta identificación de *Plasmodium* spp., se ha cuestionado porque un microscopista con experiencia puede diagnosticar 15 parásitos por microlitro de sangre; no obstante, en el caso de la mujer gestante con malaria, esta sensibilidad es insuficiente, sumado a que hay parasitemias asintomáticas (8). Se sabe que una gran proporción de mujeres gestantes residentes en zonas de alta endemia de África y Asia cursan con infecciones asintomáticas debido a cierto grado de inmunidad adquirida que disminuye las manifestaciones clínicas; no obstante, dichas infecciones pueden causar efectos adversos en las madres y en el feto, y se han relacionado con anemia y bajo peso al nacer (22). En zonas de baja endemia, como en Colombia, la infección asintomática ha sido menos estudiada. Se ha descrito un riesgo 5,4 veces mayor de tener malaria asintomática en mujeres embarazadas, en comparación con las mujeres no gestantes (23); sin embargo, su frecuencia y sus efectos son poco conocidos en este entorno.

En este estudio se encontró que 78,8 % de las embarazadas presentó fiebre en el momento del diagnóstico de malaria, lo que indica que en alrededor del 21 % de las infecciones no hubo fiebre, situación que refuerza la idea de que deben practicarse pruebas diagnósticas de malaria durante los controles prenatales para favorecer el diagnóstico oportuno. Esta frecuencia de casos afebriles es superior a lo encontrado previamente (10,2 %) en mujeres gestantes con malaria en el noroeste de Colombia (13). Tal proporción puede considerarse alta en el contexto epidemiológico colombiano, porque otros estudios, aunque en población general, han reportado ausencia de infecciones afebriles en regiones de transmisión activa (24).

No está claramente documentado en las historias si el episodio estudiado fue el primero o una recurrencia de un episodio diagnosticado durante la gestación actual, lo cual aportaría información muy útil para reconocer los casos complicados que se asocian con infección persistente. Solo en 24 casos se conocieron los antecedentes de malaria antes de la gestación, la mayoría por *P. vivax* y ocurridas en el último año, por lo cual la malaria gestacional actual podría atribuirse a una recaída. Aunque sin diferencia estadística, se observó un mayor número de episodios previos de malaria en las no complicadas, lo que está a favor de una mayor tolerancia con manifestaciones clínicas menos graves, como se ha constatado en regiones de alta endemia (25).

Una condición que posiblemente contribuye a la prevención de casos graves, es que las mujeres gestantes fueron atendidas en la primera semana del inicio de la enfermedad, 59 % durante los tres primeros días. Esta situación se explica por el cumplimiento, en el primer nivel de atención, de remitir desde los puestos de malaria a un centro hospitalario a toda mujer gestante con examen positivo y, desde allí, hacia el segundo nivel todo caso con sospecha o confirmación de gravedad.

La clasificación de los casos graves realizada por los médicos mediante la CIE-10, indica que la mayoría de los casos complicados no se reconocen como tales; solo tres casos fueron correctamente clasificados como graves entre los 26 determinados mediante los exámenes de laboratorio. Esto, sumado a que no se maneja un protocolo de atención para la malaria gestacional, puede explicar que en muchos casos no se soliciten exámenes esenciales para detectar lesiones orgánicas, como el de creatinina, nitrógeno ureico, glucemia y transaminasas, lo que impide conocer de manera completa las complicaciones producidas. Incluso, en algunos casos, no se registró información esencial como la edad gestacional durante la consulta o en el parto.

Las mujeres embarazadas con malaria presentan complicaciones con mayor frecuencia. En regiones de baja endemia se estima que hay un mayor riesgo durante el segundo y el tercer trimestres de gestación, especialmente debido a la hipoglucemia y al síndrome de dificultad respiratoria (26). En este estudio se encontró que la proporción de complicaciones fue similar en los diferentes trimestres de la gestación, aunque la mayoría de los casos de malaria (65 %) se diagnosticó durante el tercer trimestre. Dado que la infección puede adquirirse antes de la gestación y manifestarse durante el embarazo (27), no es posible saber si se adquirió en un trimestre en particular o si ya estaba presente antes de iniciado el embarazo, situación que podría explicar la mayor o menor predisposición a sufrir un cuadro clínico grave.

La presencia de signos generales de peligro se asoció con la gravedad clínica, entre ellos la ictericia, que ha demostrado ser un buen predictor de complicación (28). Además, se observaron otros signos clínicos considerados de alarma durante la gestación en 40 % de las pacientes, los cuales se relacionaron con gravedad; los más frecuentes fueron cefalea persistente, dolor abdominal y sangrado vaginal. Estos signos, además de anunciar una complicación obstétrica, pueden indicar una preeclampsia, condición que fue diagnosticada en 5,4 % de los casos estudiados y la cual se ha considerado que puede asociarse con la malaria (26).

Aunque con resultados más desfavorables en los neonatos nacidos de las mujeres gestantes con malaria grave, los efectos observados no son estadísticamente diferentes de aquellos de los neonatos nacidos de las madres sin complicación, posiblemente porque solo siete de aquellas tuvieron el parto durante su hospitalización y de los demás casos complicados no se tuvo información sobre el parto.

El estudio contiene sesgos inherentes a la falta de una medición estandarizada de la condición clínica de las pacientes y de los resultados, y a la no inclusión de las mujeres embarazadas hospitalizadas en el primer nivel de atención, aunque se espera que estos sean todos cuadros clínicos agudos, dado que existe la instrucción de remitir aquellos que muestren deterioro clínico.

La falta de información estadística a nivel nacional y departamental sobre la condición en estudio, no permitió constatar si se incluyeron razonablemente los casos diagnosticados durante el período de estudio, lo que puede constituirse en una limitación de la investigación.

Este estudio da cuenta de los casos de malaria gestacional hospitalizados durante cinco años en el departamento de Antioquia, el cual ocupa el tercer lugar en Colombia en casos de malaria. Se llevó a cabo en tres hospitales de tercer nivel de la capital a donde se remiten casos graves, y en tres de los

principales hospitales de segundo nivel localizados en las regiones endémicas, razón por la cual puede afirmarse que los casos estudiados reflejan la situación de la malaria gestacional grave y su diagnóstico en el departamento.

Permitió establecer los casos graves de malaria en mujeres embarazadas que alcanzaron a recibir atención hospitalaria de segundo y tercer nivel de complejidad, la mayoría de manera oportuna, lo que pudo haber favorecido la reducción de las complicaciones clínicas.

Se propone elaborar un protocolo para la atención hospitalaria de las mujeres embarazadas con malaria para precisar el estado clínico y lograr el registro correcto de los diagnósticos que permita un seguimiento adecuado de la paciente e, incluso, del neonato.

## Agradecimientos

Al Hospital Universitario San Vicente Fundación, al Hospital Pablo Tobón Uribe y al Hospital General de Medellín, en Medellín; al E.S.E. Hospital César Uribe Piedrahita, en el municipio de Caucasia; al Hospital Antonio Roldán Betancur, en el municipio de Apartadó, y al Hospital La Cruz E.S.E., en el municipio de Puerto Berrío, por su aval para el acceso a las historias clínicas. A los profesores de la Universidad de Antioquia, Jesús Velásquez y Juan Gabriel Piñeros, por su acompañamiento académico en la ejecución del estudio.

## Referencias

1. World Health Organization. World malaria report, 2015. Geneva. WHO; 2016. Fecha de consulta: 5 de marzo de 2018. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205559/WHO_HTM_GMP_2016.2_spa.pdf;jsessionid=DD8C013034924EE5A4599CEE0C450615?sequence=1
2. Dellicour S, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW, ter Kuile FO. Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: A demographic study. PLoS Med. 2010;7:e1000221. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000221
3. Menéndez C, Mayor A. Congenital malaria: The least known consequence of malaria in pregnancy. Semin Fetal Neonatal Med. 2007:12:207-13. https://doi.org/10.1016/j.siny.2007.01.018
4. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoa K, Brabin B, *et al.* Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. Lancet Infect Dis. 2007;7:93-104. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70021-X
5. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menéndez C. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. Am J Trop Med Hyg. 2001;64(Suppl.1):28-35.
6. Geertruyden JV, Ntakirutimana D, Erhart A, Rwagacondo C, Kabano A, D'Alessandro U. Malaria infection among pregnant women attending antenatal clinics in six Rwandan districts. Trop Med Int Health. 2005;10:681-8. https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01431.x
7. World Health Organization. Severe falciparum malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000;94(Suppl.1):1-90.
8. Nosten F, Rogerson SJ, Beeson JG, McGready R, Mutabingwa TK, Brabin B. Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum: What can we learn? Trends Parasitol. 2004;20:425-32. https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.06.007
9. Greenwood B, Alonso P, ter Kuile FO, Hill J, Steketee RW. Malaria in pregnancy: Priorities for research. Lancet Infect Dis. 2007;7:169-74. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70028-2
10. Ramal C, Pinedo P. Malaria en gestantes entre marzo del 2002 y julio del 2003: experiencia en el Hospital Regional de Loreto, Perú. Acta Med Peruana. 2008;25:220-3.
11. Chagas EC, do Nascimento CT, de Santana Filho FS, Bôtto-Menezes CH, Martínez-Espinosa FE. Impact of malaria during pregnancy in the Amazon region. Rev Panam Salud Pública. 2009;26:203-8.

12. Piñeros JG. Epidemiología de la malaria durante el embarazo. Med UIS. 2008;21:142-57.

13. Piñeros JG, Tobón A, Álvarez G, Portilla C, Blair S. Maternal clinical findings in malaria in pregnancy in a region of northwestern Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2013;89:520-6. https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0205

14. Dirección Seccional de Salud, Departamento de Antioquia. Indicadores básicos de salud 2014. Fecha de consulta: 5 de marzo de 2018. Disponible en: http://diagnosticosalud.dssa.gov.co/#

15. World Health Organization. Tratamiento del paludismo grave. Manual Práctico. 3ª edición. Ginebra: WHO; 2014. Fecha de consulta: 5 de abril de 2018. Disponible en: http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s20170es/s20170es.pdf

16. Organización Panamericana de la Salud. Guía para atención clínica integral del paciente con malaria. Bogotá: Ministerio de Protección Social; 2010. Fecha de consulta: 23 de marzo de 2018. Disponible en: https://www.paho.org/col/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=publicaciones-ops-oms-colombia&alias=1220-guia-para-la-atencion-clinica-integral-del-paciente-con-malaria&Itemid=688

17. Tobón A. Signos de peligro en el paciente con malaria. Biomédica. 2009;29:320-9. https://doi.org/10.7705/biomedica.v29i2.33

18. Menéndez C, D'Alessandro U, ter Kuile FO. Reducing the burden of malaria in pregnancy by preventive strategies. Lancet Infect Dis. 2007;7:126-35. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70024-5

19. Fernández RD, García Y, Alger J. Malaria y embarazo: observaciones clínico-epidemiológicas en dos zonas geográficas de Honduras. Rev Med Hondur. 2001;69:8-18.

20. Cottrell G, Moussiliou A, Luty AJ, Cot M, Fievet N, Massougbodji A, *et al*. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections are associated with maternal anemia, premature births, and low birth weight. Clin Infect Dis. 2015;60:1481-8. https://doi.org/10.1093/cid/civ122

21. Gavina K, Gnidehou S, Arango E, Hamel-Martineau C, Mitran C, Agudelo O, *et al*. Clinical outcomes of submicroscopic infections and correlates of protection of VAR2CSA antibodies in a longitudinal study of pregnant women in Colombia. Infect Immun. 2018;86. https://doi.org/10.1128/IAI.00797-17.

22. Uneke CJ. Impact of placental *Plasmodium falciparum* malaria on pregnancy and perinatal outcome in sub-Saharan Africa: I: Introduction to placental malaria. Yale J Biol Med. 2007;80:39-50.

23. Khan WA, Galagan SR, Prue CS, Khyang J, Ahmed S, Ram M, *et al*. Asymptomatic *Plasmodium falciparum* malaria in pregnant women in the Chittagong Hill Districts of Bangladesh. PLoS One. 2014;9:e98442. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098442

24. Osorio L, Todd J, Bradley D. Ausencia de malaria asintomática en escolares de Quibdó, Chocó. Biomédica. 2004;24:13-9. https://doi.org/10.7705/biomedica.v24i1.1244

25. Galatas B, Bassat Q, Mayor A. Malaria parasites in the asymptomatic: Looking for the hay in the haystack. Trends Parasitol. 2016;32:296-308. https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.11.015

26. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: WHO; 2015. Fecha de consulta: 19 de marzo de 2018. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127_eng.pdf?sequence=1

27. Berry I, Walker P, Tagbor H, Bojang K, Coulibaly SO, Kayentao K, *et al*. Seasonal dynamics of malaria in pregnancy in West Africa: Evidence for carriage of infections acquired before pregnancy until first contact with antenatal care. Am J Trop Med Hyg. 2018;98:534-542. doi: https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0620

28. Tobón A, Giraldo-Castro C, Blair S. Utilidad de los signos clínicos y parasitológicos en el pronóstico de la malaria grave en Colombia. Biomédica. 2012;32:79-94. https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i0.613

Biomédica 2019;39:370-84
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4387

Artículo original

# *Angiostrongylus* (*Parastrongylus*) *cantonensis* en huéspedes intermediarios y definitivos en Ecuador, 2014-2017

Luis Solórzano-Alava[1], Francisco Sánchez-Amador[1], Talía Valverde[2]

[1] Centro de Referencia Nacional de Parasitología, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Leopoldo Izquieta Pérez", Guayaquil, Ecuador
[2] Centro de Especialidades Letamendi, Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social, Guayaquil, Ecuador

**Introducción.** *Angiostrongylus cantonensis* es un serio problema de salud pública y está ampliamente distribuido en el país. Cuando el parásito infecta a los caracoles terrestres *Achatina*, se enquista en su interior y puede infectar accidentalmente a las personas y otros mamíferos.
**Objetivo.** Establecer la distribución geográfica de *A. cantonensis* en huéspedes intermediarios (*Achatina fulica)* y definitivos (*Rattus* spp.) en Ecuador entre el 2014 y el 2017.
**Materiales y métodos.** Se recolectaron 2.908 ejemplares de *A. fulica* en 16 provincias utilizando el método de captura por unidad de esfuerzo durante 30 minutos. Se capturaron 211 ejemplares de las especies huéspedes, de los cuales 20 eran *Rattus rattus* y 191 *R. norvegicus.* Los ejemplares fueron transportados para su análisis al Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación en Guayaquil.
En los tejidos del caracol se identificaron y se contabilizaron larvas L3 que luego se inocularon en ratas de laboratorio para reproducir el ciclo de vida. En los roedores se disecaron los cerebros, los corazones, las arterias pulmonares y los pulmones, y se identificaron los parásitos por morfología taxonómica.
**Resultados.** De los caracoles recolectados se encontraron 441 positivos para *A. cantonensis* (15,2 %) y un total de 6.166 larvas L3. En los ejemplares *Rattus* spp. capturados (211), 77 (36,5 %) estaban infectados con *A. cantonensis,* con un total de 220 parásitos (larvas L4-L5 y adultos).
**Conclusiones.** Se constató la presencia de *A. cantonensis* en varias provincias, lo que confirma el carácter endémico de esta zoonosis en el territorio nacional. La presencia de *Rattus* spp., huésped definitivo del parásito, y de huéspedes intermediarios, indica el potencial zoonótico de esta infección parasitaria.

**Palabras clave:** *Angiostrongylus cantonensis*; ratas; interacciones huésped-parásitos; Ecuador.

### *Angiostrongylus* (*Parastrongylus*) *cantonensis* on intermediate and definitive hosts in Ecuador, 2014-2017

**Introduction:** *Angiostrongylus cantonensis* is a serious public health problem and is widely distributed in the country. When the parasite infects the snails, it becomes deeply embedded in their interior and accidentally, it can infect people and other mammals.
**Objective:** To establish the geographical distribution of *A. cantonensis* intermediate hosts (*Achatina fulica*) and definitive hosts (*Rattus* spp.) in Ecuador from 2014 to 2017.
**Materials and methods:** We collected 2,908 *A. fulica* specimens in 16 provinces using the capture method per unit of effort for 30 minutes. We captured 211 hosts of which 20 were *Rattus rattus* and 191 *R. norvegicus*. The specimens were transported to the *Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación* in Guayaquil where the larvae L3 were identified and counted in the tissues of the snail, which were then inoculated in laboratory rats to reproduce the life cycle. In the rodents, the brains, hearts, lung arteries and lungs were dissected, and the parasites were identified by taxonomic morphology.
**Results:** Of the snails harvested, 441 were positive for *A. cantonensis* (15.2%) and a total of 6,166 L3 larvae were found; 77 (36.5%) specimens of *Rattus* spp., were infected with *A. cantonensis* and a total of 220 parasites (L4-L5 larvae and adult worms) were collected.
**Conclusions:** We confirmed the presence of *A. cantonensis* in several provinces, which ratifies the endemic nature of this zoonosis in the national territory. *Rattus* spp. specimens constitute the definitive hosts of the parasite, which together with the presence of intermediate hosts, indicates the zoonotic potential of this parasitic infection.

**Keywords:** *Angiostrongylus cantonensis*; rats; host-parasite interactions; Ecuador.

**Recibido:** 16/05/18
**Aceptado:** 07/10/18
**Publicado:** 11/10/18

**Citación:**
Solórzano-Alava L, Sánchez-Amador F, Valverde T. *Angiostrongylus* (*Parastrongylus*) *cantonensis* en huéspedes intermediarios y definitivos en Ecuador, 2014-2017. Biomédica. 2019;39:370-84.
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4387

**Correspondencia:**
Luis Fernando Solórzano, Centro de Referencia Nacional de Parasitología, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Leopoldo Izquieta Pérez", Avenida Julián Coronel 905 Esmeraldas y José Mascote, Guayaquil, Ecuador
Teléfono: (+593) 4228 8096
luisfernando.solorzano@gmail.com

**Contribución de los autores:**
Luis Fernando Solórzano: obtención del parásito *A. cantonensis* en caracoles y ratas
Todos los autores participaron en el diseño metodológico, la recolección y la captura de moluscos y roedores, el análisis de datos y la escritura del manuscrito.

**Financiación:**
El presente estudio fue financiado por los propios autores.

**Conflicto de intereses:**
No se declaró ninguno.

*Angiostrongylus cantonensis*, un parásito zoonótico transmitido en los alimentos, se ha reconocido como el agente patógeno primario asociado con la meningitis eosinofílica humana o meningoencefalitis eosinofílica. Se han informado miles de casos de meningitis eosinofílica causada por este parásito en todo el mundo. La angiostrongiliasis es una enfermedad de importancia creciente en salud pública, ya que la globalización contribuye a su diseminación y a la infección de huéspedes vulnerables (1).

El parásito está ampliamente distribuido en Ecuador y constituye un serio problema de salud pública. Cuando *A. cantonensis* infecta a los caracoles, el parásito se aloja en la cavidad paleal de su manto. Las personas y mamíferos superiores se infectan directa e indirectamente al manipular o ingerir caracoles crudos o por alimentos contaminados por ellos (2).

*Angiostrongylus cantonensis* fue descrito por primera vez en 1935. Se encontró en los pulmones de *Rattus rattus* y *R. norvegicus* capturados en Cantón, China, por lo que se le reportó como *Pulmonema cantonensis* (3). En 1981 se demostró un caso clínico de meningitis eosinofílica causado por *A. cantonensis* en Cuba (4) y en la década de los sesenta la enfermedad apareció en Okinawa, en las islas Ryukyu, Honshu y Kyushu, en Nueva Bretaña, Samoa Americana y Samoa Occidental, Australia, Fiji y en China continental (5).

La infección se ha presentado principalmente en la cuenca del Pacífico, en Hawai (6), y en el sudeste asiático, en Tailandia, Vanuatu, Islas Marshall, Islas Carolinas, Islas Cook, Filipinas, Nueva Caledonia y Tahití (7).

En Cuba, se llevaron a cabo diversos estudios en la década de los años 80. En la provincia de Camagüey se demostró que más del 60 % de los moluscos recolectados vivos, pertenecientes a cuatro especies, estaban infectados de forma natural con larvas L3 de *A. cantonensis* (8).

En Brasil se han encontrado moluscos terrestres con infección natural por *A. cantonensis* en las regiones del nordeste y del sureste (9,10).

En el 2008 se describió el primer foco de transmisión natural de *A. cantonensis* en Ecuador y actualmente el parásito es endémico en este país. Uno de sus principales huéspedes intermediarios es el también llamado caracol gigante africano (*Achatina fulica*). Este molusco habita en las zonas urbanas y en las rurales, y es uno de los principales transmisores de meningoencefalitis eosinofílica y angiostrongiliasis ocular por alimentos contaminados o por la ingestión del caracol crudo (11).

En ese mismo año se reportaron diferentes brotes de angiostrongilosis en los recintos La Ercilia y Sabanetilla en el cantón Ventanas de la provincia de Los Ríos, y en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, y se encontró el parásito en caracoles terrestres (*A. fulica*) y acuáticos (*Pomacea* spp.), así como en roedores (*Rattus* spp.) (11,12).

La infección por *A. cantonensis* es la causa más común de meningitis eosinofílica infecciosa en humanos y produce angiostrongiliasis en el sistema nervioso central. En el Caribe, el parásito se ha encontrado en en las Antillas Mayores, en Cuba, República Dominicana, Haití, Puerto Rico y Jamaica, y en las Antillas Menores, en Granada y Guadalupe (13).

El objetivo de este trabajo fue establecer la distribución geográfica del parásito en huéspedes intermediarios (caracoles) y definitivos (roedores) en Ecuador entre el 2014 y el 2017. El conocimiento de la distribución geográfica

de los huéspedes intermediarios y definitivos contribuirá al establecimiento de medidas puntuales en esas zonas para prevenir la aparición de nuevos casos.

## Materiales y métodos

Entre enero del 2014 y diciembre del 2017 se recolectaron manualmente 2.908 ejemplares de caracol gigante africano (*A. fulica*) con el método de captura por unidad de esfuerzo durante 30 minutos (14,15). Posteriormente, fueron puestos en recipientes plásticos, etiquetados (origen, cantidad y especies) y transportados al Instituto Nacional en Salud Pública e Investigación "Leopoldo Izquieta Pérez" en Guayaquil (15).

La recolección se llevó a cabo en 16 provincias continentales, a saber: Guayas, Santa Elena, Santo Domingo de los Tsáchilas, Napo, Los Ríos, Chimborazo, Pichincha, El Oro, Cañar, Sucumbíos, Francisco de Orellana, Pastaza, Zamora Chinchipe, Esmeraldas, Bolívar y Manabí.

Los caracoles se examinaron en busca de larvas L3 de *A. cantonensis* empleando el método modificado de Lobato-Paraense para la extracción de los órganos blandos de los moluscos (15). Estos se sumergieron en una solución de digestión (16) y se observaron para identificar y contabilizar las larvas (L3) según las características taxonómicas de Cowie y Thiengo, *et al.* (17,18), usando un estereomicroscopio Motic SMZ-168™. A continuación, fueron inoculadas en ratas albinas adultas hembras (*R. norvegicus*) para hacer el seguimiento del ciclo biológico en el Centro de Referencia Nacional de Parasitología (8) (figura 1).

En la captura de las ratas silvestres se usaron nueve trampas Tomahawk (15 x 15 x 45 cm), colocadas estratégicamente durante la noche en lugares donde había indicios de la presencia de roedores, tales como heces, materiales roídos y rincones oscuros, las cuales se revisaban temprano en la mañana siguiente (19).

Posteriormente, se examinaron las heces para observar si había larvas L1 de *A. cantonensis*. Se examinó la cavidad torácica (corazón, arterias pulmonares y pulmones) en busca de los nematodos parásitos, juveniles o adultos. Se contaron los nematodos adultos encontrados en la luz de la arteria pulmonar y se guardaron en una solución de formaldehído al 3 % (11) (figuras 2, 3 y 4).

La morfología de la bursa y el tamaño de las espículas caudales se utilizaron como características taxonómicas para la identificación (4). Se practicó la craneotomía de la bóveda cefálica, de la cual se extrajo el encéfalo para la búsqueda de ninfas L4-L5 de *A. cantonensis*. Se estableció la prevalencia de ratas con el parásito *A. cantonensis* tanto en estadio larvario L4-L5 como en los estadios adultos (machos y hembras), y el número total de ratas capturadas por provincia (8,10).

### *Consideraciones éticas*

Este estudio obtuvo los permisos legales contemplados en la Plataforma del Bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación en Guayaquil (Ecuador) y se ajustó a las normas de la "Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio" del Ministerio de Salud de Perú, 2008 (20).

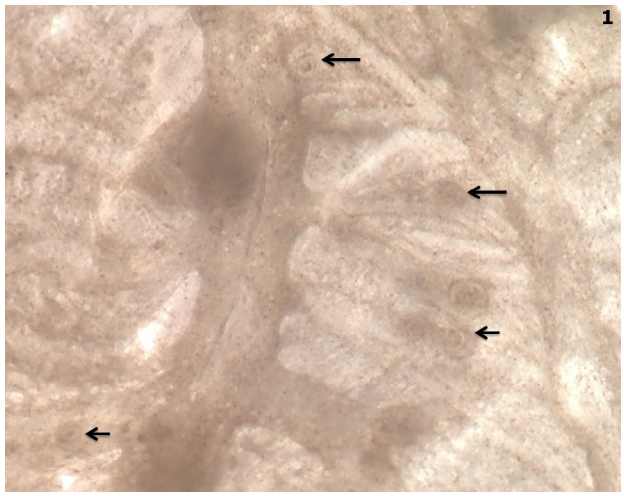



**Figura 1.** Larvas L2 y L3 de *Angiostrongylus cantonensis*, enquistadas el interior de la membrana paleal de *Achatina fulica*.

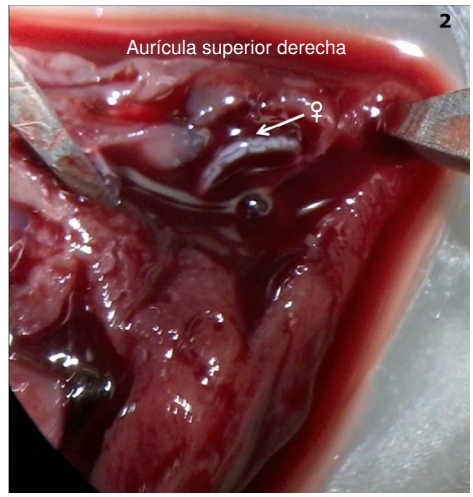



**Figura 2.** Hembra adulta A*ngiostrongylus cantonensis* en el interior de la aurícula superior derecha de *Rattus norvegicus*

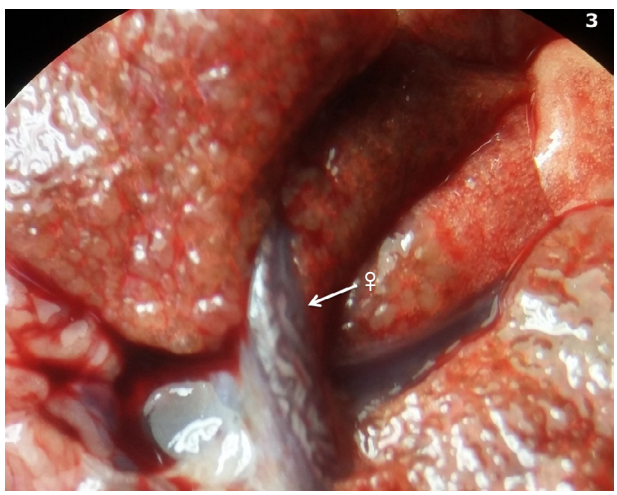



**Figura 3.** Hembras adultas de *Angiostrongylus cantonensis* emergiendo a partir de las arterias pulmonares de *Rattus norvegicus*

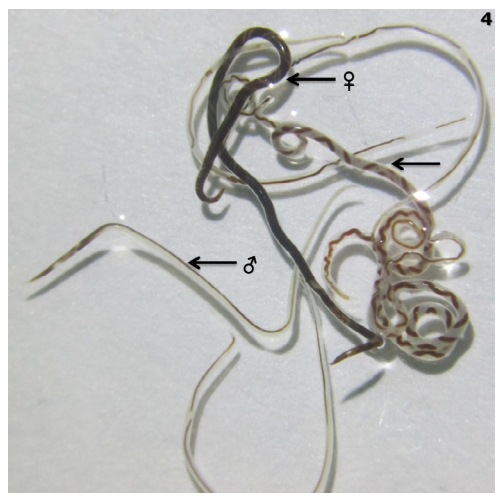



**Figura 4.** Adultos machos y hembras de *Angiostrongylus cantonensis* de *Rattus norvegicus*. El gusano más oscuro corresponde a una hembra de mayor edad.

## Resultados

Se encontraron 441 caracoles positivos para *A. cantonensis*, con una prevalencia total de 15,2 % durante los tres años en las 16 provincias continentales seleccionadas. Solamente en una provincia (Manabí) no se encontró *A. cantonensis* en el interior de los moluscos (cuadro 1).

En el 2017, se encontraron 6.166 larvas L3 de *A. cantonensis* en el interior de *A. fulica*. En el cuadro 2 y en la figura 5 se presenta la información de la recolección por cantón perteneciente a cada provincia y según el número de caracoles recolectados, el número de caracoles parasitados por *A. cantonensis* y el número total de larvas que se encontraron en su interior.

Los valores por provincia se establecieron en tres categorías por rangos del número de larvas en el interior del manto del caracol: I, de 0-19; II, de 20-71, y III, 72-150 (cuadro 3).

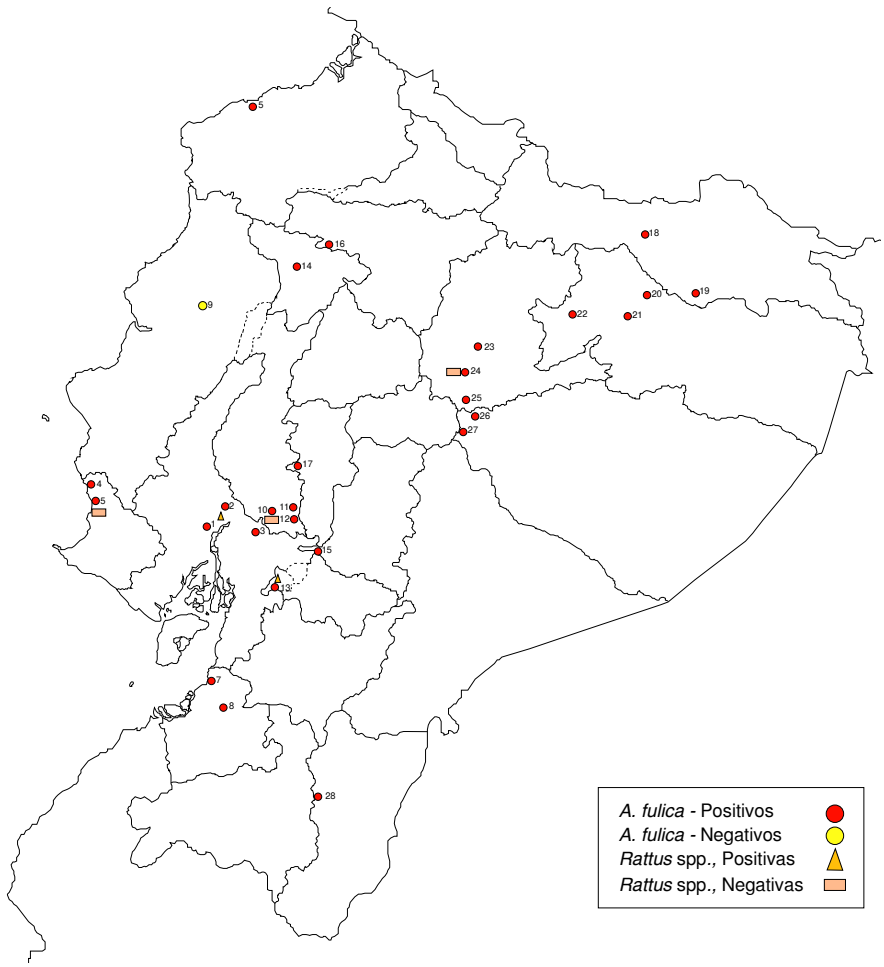
**Cuadro 1.** Caracoles gigantes africanos (*Achatina fulica*), caracoles con *Angiostrongylus cantonensis* presentes y número de parásitos por provincia en Ecuador

| Provincias | Caracoles (n) | Caracoles positivos (n) | Larvas L3 (n) | Prevalencia * (%) |
|---|---|---|---|---|
| Guayas | 263 | 24 | 1617 | 9,1 |
| Santa Elena | 50 | 4 | 17 | 8,0 |
| Napo | 324 | 88 | 228 | 27,2 |
| Santo Domingo de los Tsáchilas | 234 | 80 | 292 | 34,2 |
| Los Ríos | 449 | 28 | 3.092 | 6,2 |
| Chimborazo | 112 | 31 | 27 | 27,7 |
| Pichincha | 20 | 2 | 14 | 10,0 |
| El Oro | 168 | 49 | 44 | 29,2 |
| Sucumbíos | 132 | 32 | 128 | 24,2 |
| Francisco de Orellana | 197 | 34 | 193 | 17,3 |
| Pastaza | 108 | 9 | 35 | 8,3 |
| Cañar | 320 | 44 | 319 | 13,8 |
| Esmeraldas | 210 | 11 | 69 | 5,2 |
| Bolívar | 41 | 2 | 70 | 4,9 |
| Zamora Chinchipe | 35 | 3 | 21 | 8,6 |
| Manabí | 245 | 0 | 0 | 0,0 |
| Total | 2.908 | 441 | 6.166 | 15,2 |

* Prevalencia de positividad de *Achatina fulica*

**Cuadro 2.** Número de caracoles *Achatina fulica*, caracoles positivos para *Angiostrongylus cantonensis* y cantidad de parásitos encontrados en cada cantón

| No. | Cantones - Recintos | Caracoles (n) | Positivos (n) | Parásitos (n) |
|---|---|---|---|---|
| | **Costa - Región Litoral** | | | |
| 1 | Guayaquil - Guayas | 106 | 0 | 0 |
| 2 | AB Moreno - Guayas | 129 | 24 | 1.617 |
| 3 | Daule - Guayas | 28 | 0 | 0 |
| 4 | Olón - Santa Elena | 25 | 2 | 15 |
| 5 | Manglar Alto – Santa Elena | 25 | 2 | 2 |
| 6 | Esmeraldas – Esmeraldas | 210 | 11 | 69 |
| 7 | El Guabo - El Oro | 144 | 46 | 44 |
| 8 | Pasaje - El Oro | 24 | 3 | 7 |
| 9 | Chone - Manabí | 245 | 0 | 0 |
| 10 | Babahoyo - Los Ríos | 244 | 5 | 5 |
| 11 | Montalvo - Los Ríos | 150 | 21 | 3.085 |
| 12 | Mata de Cacao - Los Ríos | 55 | 2 | 2 |
| | **Sierra - Región Interandina** | | | |
| 13 | La Troncal - Cañar | 320 | 44 | 319 |
| 14 | Santo Domingo de los Tsáchilas | 234 | 80 | 292 |
| 15 | Cascajal - Chimborazo | 112 | 31 | 27 |
| 16 | S Miguel de Los Bancos - Pichincha | 20 | 2 | 14 |
| 17 | Echeandía - Bolívar | 41 | 2 | 70 |
| | **Amazonia - Región Oriental** | | | |
| 18 | Lago Agrio - Sucumbíos | 42 | 14 | 80 |
| 19 | Sushufindi - Sucumbíos | 64 | 14 | 41 |
| 20 | Joya de los Sachas - Orellana | 94 | 18 | 117 |
| 21 | Fco. de Orellana - Orellana | 61 | 12 | 55 |
| 22 | Loreto - Orellana | 68 | 8 | 28 |
| 23 | Archidona - Napo | 64 | 11 | 150 |
| 24 | Tena - Napo | 60 | 6 | 6 |
| 25 | Carlos Arosemena Tola - Napo | 200 | 71 | 72 |
| 26 | Santa Clara - Pastaza | 56 | 6 | 26 |
| 27 | Puyo - Pastaza | 52 | 3 | 9 |
| 28 | Zamora Chinchipe - Zamora | 35 | 3 | 17 |




(1) Guayaquil; (2) AB Moreno; (3) Daule; (4) Olón; (5) Manglar Alto; (6) Esmeraldas; (7) El Guabo; (8) Pasaje; (9) Chone; (10) Babahoyo; (11) Montalvo; (12) Mata de Cacao; (13) La Troncal; (14) Santo Domingo; (15) Cascajal; (16) SM de los Bancos; (17) Echeandía; (18) Lago Agrio; (19) Sushufindi; (20) Joya de los Sachas; (21) Fco. Orellana; (22) Loreto; (23) Archidona; (24) Tena; (25) Carlos Arosemena Tola; (26) Santa Clara; (27) Puyo; (28) Zamora

**Figuras 5.** Mapa político del Ecuador con los puntos de referencia donde se capturaron caracoles (*Achatina fulica*) y roedores (*Rattus* spp.) positivos para *Angiostrongylus cantonensis* y negativos para el parásito

**Cuadro 3.** Cantidad de parásitos *Angiostrongylus cantonensis* en caracoles gigantes africanos (*Achatina fulica*) en diferentes provincias de Ecuador, divididas en tres categorías según el número de larvas en el interior del manto del caracol: I, de 0-19; II, de 20-71, y III, 72-150 (2017)

| Provincias | Categoría I | Categoría II | Categoría III |
|---|---|---|---|
| Guayas | 6 | 10 | 8 |
| Santa Elena | 2 | 2 | 0 |
| Napo | 82 | 6 | 0 |
| Santo Domingo de los Tsáchilas | 37 | 2 | 1 |
| Los Ríos | 12 | 4 | 12 |
| Chimborazo | 16 | 6 | 0 |
| Pichincha | 2 | 0 | 0 |
| El Oro | 39 | 5 | 0 |
| Sucumbíos | 30 | 2 | 0 |
| Orellana | 33 | 1 | 0 |
| Pastaza | 9 | 0 | 0 |
| Cañar | 22 | 2 | 1 |
| Esmeraldas | 8 | 1 | 0 |
| Manabí | 0 | 0 | 0 |

Se identificaron 20 especímenes de *R. rattus* y 191 de *R. norvegicus*, que se analizaron en Guayaquil en el Centro de Referencia Nacional de Parasitología del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación.

De los 20 ejemplares de *R. rattus*, siete se encontraron infectados con *A. cantonensis*, con una prevalencia de 35 % y 30 parásitos recolectados. De los 191 especímenes de *R. norvegicus*, 68 se encontraron infectados con *A. cantonensis*, para una prevalencia de 35,6 % en un total de 220 organismos recolectados. De los 211 especímenes, en uno de *R. norvegicus* se encontró el parásito en la bóveda cefálica en estadio larvario L4-L5, con un total de 62 organismos; en el corazón de un ejemplar de *R. norvegicus* se encontró un ejemplar en estadio L5 y adulto (cuadro 4 y figura 5).

Los parásitos se encontraron en la aurícula derecha del corazón en la mayoría (55/68) de los casos. En el corazón y en los pulmones se observaron algunas zonas hemorrágicas, fibrosis y abscesos.

En la Provincia del Guayas se encontraron ratas positivas para *A. cantonensis,* de las cuales siete eran *R. rattus* y 55 *R. norvegicus*. En las provincias de Los Ríos y Cañar se encontraron un solo roedor positivo y uno negativo, respectivamente. No se encontraron roedores positivos en la provincia de Santa Elena, ni en Napo (cuadro 4).

**Cuadro 4.** Prevalencia de *Angiostrongylus cantonensis* en *Rattus* spp., por provincias, total de parásitos, roedores negativos, total general y porcentajes

| No. | Provincias - Cantón | *Angiostrongylus cantonensis* (n) | Parásitos (n) | Negativas (n) | Total (n) | Porcentaje (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Guayas - Guayaquil | 75 | 213 | 125 | 200 | 37,5 |
| 10 | Los Ríos - Babahoyo | 1 | 2 | 1 | 2 | 50,0 |
| 13 | Cañar/La Troncal | 1 | 5 | 1 | 2 | 50,0 |
| 4 | Santa Elena/Olón | 0 | 0 | 5 | 5 | 0,0 |
| 25 | Napo/Tena | 0 | 0 | 2 | 2 | 0,0 |
| | Total | 77 | 220 | 134 | 211 | 36,5 |

## Discusión

En estudios hechos en moluscos en 18 condados de Florida, Estados Unidos, entre el 2013 y el 2015, se hallaron 1.437 huéspedes intermediarios (caracoles) pertenecientes a 32 especies de gasterópodos, de los cuales 27 (1,9 %) fueron positivos para *A. cantonensis*. Las muestras fueron confirmadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (21).

En los trabajos en *A. fulica* llevados a cabo en nueve municipios que forman la Baixada Santista de São Paulo, Brasil, se encontró que de 540 caracoles analizados, 117 (21,7%) estaban infectados con *A. cantonensis* (22).

Los estudios efectuados en los moluscos *T. pisana* y *P. lamarckii* en el 2015 en Tenerife, Islas Canarias, España, reportaron 19,3 % de larvas L3 de *A. cantonensis*, confirmados por el método de *Loop-mediated Isothermal Amplification*, LAMP (23).

En un estudio realizado entre el 2010 y el 2011 en el subdistrito de ThaPho, Phitsanulok, Tailandia, 38 de 307 caracoles *A. fulica* presentaron *A. cantonensis*, es decir, una tasa de infección general de 12,38 % (24).

Los estudios realizados en Ecuador durante el periodo de 2008 a 2011 en seis de las 10 provincias previamente seleccionadas para este estudio, se encontraron ejemplares de *A. fulica* infectados con *A. cantonensis* (2,11,12). Posteriormente, durante el 2012, en diez de las catorce provincias seleccionadas se detectó la presencia de *A. cantonensis* en los caracoles. De un total de 2.784 caracoles, 1.054 correspondieron al género *Pomacea* spp., y 1.730 a *Achatina* sp., y la positividad total para el parásito fue de 11,2 % (11).

En el presente estudio de tres años, se encontró un 15,2 % de caracoles infectados con *A. cantonensis,* lo que evidencia un incremento en comparación con los estudios anteriores. Se constató su presencia en las mismas provincias estudiadas previamente (2008-2012) y en ocho más: Santa Elena, Napo, Pichincha, Sucumbíos, Francisco de Orellana, Pastaza, Cañar y Zamora Chinchipe.

En Ecuador este caracol exótico se introdujo en la provincia de Esmeraldas en el 2005 (8,11,12,15), probablemente traído de Asia con fines comerciales que no tuvieron éxito. Su gran capacidad reproductiva y la tendencia de las personas a liberarlos en la naturaleza son, probablemente, las razones de la rápida invasión de esta especie (15) que hoy se encuentra en la mayoría de las provincias de Ecuador. Sus voraces hábitos alimenticios, entre otros factores, contribuyen al exterminio de la flora y la fauna endémicas, reducen los recursos disponibles y aumentan la competencia por el espacio físico.

El aumento de la presencia de *A. cantonensis* en el país probablemente es el resultado de la rápida propagación de su huésped intermediario, *A. fulica*, lo que contribuye a la dispersión de este parásito y a la infección del huésped definitivo.

En el estudio en ratas silvestres (*Rattus* spp.) en tres de los 18 condados seleccionados en Florida, Estados Unidos, entre el 2013 y el 2015, se encontró que de 171 ejemplares de *R. rattus* recolectados, 39 (22,8 %) estaban infectados con *A. cantonensis* (21).

En los estudios en Tenerife, España, se encontró una seroprevalencia en ratas de 55,6 % determinada mediante el método de ELISA (23 ).

La prevalencia de *A. cantonensis* en ejemplares de *R. norvegicus* en Río de Janeiro fue relativamente alta en 146 ratas, es decir, una prevalencia de 71 %, mayor que en otros estudios anteriores en Brasil (25).

En áreas de Cuba y República Dominicana se han registrado porcentajes altos (60 %; 12/20) de ratas infectadas con *A. cantonensis* (26).

Entre el 2008 y el 2011, en Ecuador se encontró una prevalencia de 11 % en ejemplares de *Rattus* spp. en dos provincias (11,12). En el presente estudio de tres años, se capturaron ejemplares de *Rattus* spp. en 5 de las 16 provincias seleccionadas (incluidas las provincias estudiadas entres el 2008 y el 2012), en las cuales se registró una prevalencia de 37,5 %, en las zonas urbanas más habitadas de la provincia de Guayas.

En la isla de Hawái, el 72,7 % (396/545) de los ejemplares de *Rattus* spp. analizados estaba infectado con lombrices adultas, y el 93,9 % (512/545) de las ratas resultó positivo para la infección por *A. cantonensis* determinado por la presencia de gusanos adultos vivos, gusanos adultos enquistados, larvas L3 o por PCR en tejido cerebral.

La prevalencia excepcionalmente alta de la infección por *A. cantonensis* en *Rattus* spp. en la isla de Hawái es motivo de preocupación e indica que el potencial de infección humana con esta zoonosis emergente es mayor de lo que se pensaba anteriormente (27).

Sin embargo, el reducido tamaño de la muestra en estos estudios a corto plazo no permitió obtener resultados concluyentes e impidió la inferencia de la estructura (25). En el presente estudio se observó una prevalencia alta y estable de *A. cantonensis* en los tres años en comparación con los estudios anteriores (11,12).

Esta prevalencia estable también podría explicarse por los siguientes hechos: una larga vida del parásito en el huésped definitivo y la liberación de larvas L1 durante prolongados períodos, lo cual puede mantener la transmisión del parásito al huésped intermedio incluso en tiempos de baja abundancia del caracol en el entorno (25,26); la presencia de más de una especie de molusco, lo que puede facilitar el desarrollo de la fase larvaria infecciosa L3 (25,29); la ausencia de factores que limiten la abundancia de la rata (por ejemplo, disponibilidad de refugio constante y de alimentos), y la heterogeneidad genética de *A. cantonensis*, que puede facilitar la adaptación a nuevos entornos (25,28,30).

La meningitis eosinofílica se considera una zoonosis parasitaria que afecta a las ratas, el huésped definitivo, en el cual los gusanos adultos hembras y machos se localizan en las arterias pulmonares. Después de la cópula, las hembras ponen sus huevos que luego eclosionan en las ramas terminales de las arterias pulmonares y producen larvas de primer estadio (L1). Estas larvas migran a la tráquea, son deglutidas, pasan al tracto gastrointestinal y son eliminadas en las heces. Al ser ingeridas por moluscos (caracoles terrestres y marinos), que son huéspedes intermediarios, experimentan dos mudas hasta convertirse en larvas del tercer estadio (L3), la forma infecciosa para el hombre y otros mamíferos, los cuales completan el ciclo al ingerir los caracoles infectados. Las larvas penetran la pared intestinal y migran por el sistema circulatorio, y en el transcurso de dos a tres días llegan al cerebro, donde mudan dos veces hasta convertirse en larvas de cuarto (L4) y quinto estadio (L5) (adultos jóvenes). Posteriormente, los parásitos migran a la arteria pulmonar y a las cavidades del corazón derecho, el asentamiento en este último hábitat se produce aproximadamente cuatro semanas después de la ingestión de larvas L3 (8).

Desde la primera notificación de infección humana por *A. cantonensis* en Taiwán, en 1945, se han informado brotes importantes en China continental y se han registrado casos en diferentes regiones del mundo, aproximadamente en 30 países. La amenaza no es solo para las personas que viven en las zonas endémicas, sino también para aquellas que visitan estas regiones. Como ya se mencionó, el parásito es endémico en el sur de Asia, en las islas del Pacífico y del Caribe y en partes de Australia, el sudeste de Estados Unidos, Egipto, Nigeria, Costa de Marfil y Sudamérica (Brasil y Ecuador). La infección por *A. cantonensis* ha atraído cada vez más atención debido a los brotes y a un número creciente de casos esporádicos reportados en viajeros que regresan a Europa de regiones endémicas (31).

En 1987, *A. cantonensis* se identificó por primera vez en Norteamérica en roedores. Aunque el ensayo de PCR no detectó la lombriz intestinal como *A. cantonensis* en las muestras de los huéspedes intermediarios (caracoles) en Houston, Texas, el parásito ha sido identificado repetidas veces en los

estados del sureste y del golfo de México, y, paralelamente, las infecciones humanas han aumentado. En 1995, se presentó un caso de una meningitis por *A. cantonensis* en un niño de 10 años de Nueva Orleans, Louisiana, que había comido caracoles crudos. Además, se informaron dos casos adicionales en niños de Houston en la primavera del 2016 (31,32).

Al terminar el 2009, se reportaron casos y brotes de angiostrongiliasis en al menos nueve provincias de la República Popular China (457 casos detectados). Allí, las personas se infectan con *A. cantonensis* al consumir intencionalmente babosas y caracoles crudos o poco cocinados. La mayoría de los casos notificados provienen del sur del país y de otras partes del sudeste de Asia, especialmente el nordeste de Tailandia, donde los caracoles crudos o ligeramente cocidos se consideran un manjar (33).

Se ha demostrado que los viajeros que visitan áreas endémicas, particularmente aquellos que acampan, comen la cocina local, consumen moluscos crudos de agua dulce, o frutas y vegetales crudos, están en riesgo de contraer la infección por nematodos (34).

Desde 1945 se han reportado casi 3.000 casos en todo el mundo, la mayoría en el sur de China, pero el parásito se está extendiendo y ahora hay muchos más. En los Estados Unidos, casi todos los casos se han registrado en Hawái, donde se reportaron 104 casos entre 1959 y 2016. El parásito también está presente en los estados del sudeste. Además, a medida que el clima se calienta, es probable que este parásito tropical y subtropical se extienda aún más (35).

En Brasil se han reportado siete casos en humanos desde el 2007 en las regiones del sureste y el nordeste (36). En el 2014 se publicó una serie de 34 casos diagnosticados mediante ELISA y confirmados por RT-PCR (37). El aumento de caracoles infectados se describió como una de las principales causas de la aparición de casos de meningoencefalitis eosinofílica en humanos (10).

*Angiostrongylus cantonensis* se ha reportado en 16 sitios geográficos a lo largo del continente americano, en seis especies huéspedes definitivas y en cinco especies accidentales. Del total de registros, solo en cuatro, tres en Brasil y uno en Haití, no se evidenció una coincidencia entre el hallazgo del huésped definitivo y el registro de la enfermedad. La mayoría de los casos de la enfermedad coinciden con el hallazgo definitivo del huésped. Sin embargo, en algunos lugares hay vacíos de información entre el informe del huésped definitivo y el registro de la enfermedad. La expansión de la población y los cambios climáticos invitan a ampliar y completar el rango de observación de las especies que implican posibles riesgos epidemiológicos (36).

En muchas áreas, principalmente tropicales, las poblaciones humanas han invadido ambientes naturales y sus condiciones socioeconómicas no permiten una atención médica adecuada, por lo cual muchos casos pueden haber pasado desapercibidos o no fueron reconocidos a lo largo de los años (38,39).

La frecuencia de las infecciones por *A. cantonensis* en humanos probablemente no se notifica debido a una combinación de factores, incluido el frecuente curso autolimitado de la infección, la falta de conocimiento del parásito, la disponibilidad limitada de pruebas de diagnóstico y la falta de vigilancia nacional. Aunque en la mayoría de los casos la enfermedad se resuelve espontáneamente, las tasas de letalidad pueden alcanzar el 5 % (40,41).

La angiostrongiliasis cerebral debido a *A. cantonensis* sigue afectando la salud humana y la productividad en Tailandia. Los hábitos alimenticios de la población han sido un importante factor, particularmente en el nordeste del país, donde la enfermedad es endémica y los indígenas disfrutan de un plato local de caracoles poco cocidos llamado 'koi-hoi', generalmente como un aperitivo cuando ingieren bebidas alcohólicas después de sus actividades agrícolas diarias (42).

En la isla de Hainan en China, de las 118 ratas atrapadas durante las encuestas de campo, 13 ejemplares de *R. norvegicus* se encontraron infectadas con *A. cantonensis*. La tasa de infección fue de 11,02 %. Se examinaron 1.612 moluscos, 21,3 % de los cuales albergaba larvas L3 de *A. cantonensis*. Se recolectaron y analizaron 459 muestras de suero y 92 de ellas fueron positivas para *A. cantonensis*. La tasa global de anticuerpos positivos fue de 20,04 % (43). En otro estudio en esta misma provincia, se detectó inmunoglobulina G (IgG) anti *A. cantonensis* en 20 de 393 (6 %) participantes, 12 de los cuales consumían habitualmente caracoles crudos (44).

En la provincia de Guangdong, 42 de 300 personas (14 %) tenían anticuerpos IgG contra *A. cantonensis*, y cinco de ellas habían estado expuestas recientemente, según se comprobó al detectar IgM circulante (45).

En cuanto a la infección en humanos en Ecuador, hasta el 2009 se habían informado siete brotes en varias provincias del país, los cuales afectaron a 19 adultos y siete niños. Se estima que hasta hoy ha habido más de 87 casos humanos y tres muertes. En un artículo publicado por Guerrero, *et al.,* en el 2008, se informó sobre la presencia del parásito en el tejido cerebral de uno de los pacientes fallecidos (46).

En 15 provincias de Ecuador se han encontrado caracoles infectados, con porcentajes de infección en *A. fulica* y *Pomacea* spp. de hasta 30 % (datos del INSPI no publicados), además de un 36,5 % de ratas infectadas según estudios efectuados por el Centro de Referencia Nacional de Parasitología del INSPI en diferentes provincias.

En el primer estudio nacional sobre *A. cantonensis* en China, se estableció una serie de factores implicados en la aparición de casos humanos, a saber:

1. el área endémica de *A. cantonensis* es muy amplia y cubre siete provincias del sur, las cuales deben considerarse potencialmente endémicas;
2. la presencia de varios caracoles de agua dulce y terrestres en los mercados y restaurantes locales, pues se registraron caracoles *P. canaliculata* y *A. fulica* infectados con *A. cantonensis* que claramente estaban destinados al consumo humano, lo cual sugiere que la transmisión del parásito a los seres humanos se sigue produciendo y que las campañas de educación sanitaria y sensibilización iniciadas después del brote del 2006 en Pekín, dirigidas a los consumidores, el personal de salud y los funcionarios, deben mejorarse para detener el consumo de caracoles infectados;
3. los hábitos alimenticios de ciertos grupos étnicos aumentan el riesgo de infección por *A. cantonensis;* por ejemplo, el consumo de caracoles de agua dulce crudos o poco cocidos fue responsable del brote de angiostrongiliasis a principios del 2008 en Dali; por ello, los

viajeros deberían estar mejor informados sobre los riesgos asociados con ciertos alimentos, y las regulaciones sobre su consumo e higiene deben aplicarse, y

4. las dos especies de moluscos invasores que facilitan la propagación y la transmisión de *A. cantonensis* en China son *P. canaliculata* y *A. fulica*, responsables de la endemia de este parásito (47).

La principal conclusión de este estudio fue que se amplió el número de provincias ecuatorianas estudiadas y se constató la presencia de *A. cantonensis* en ellas, lo cual confirma el carácter endémico de esta zoonosis en regiones urbanas y rurales del país. *Rattus rattus* y *R. norvegicus* son los huéspedes definitivos del parásito, lo que unido a la existencia de huéspedes intermediarios en casi todo el país, evidencia el potencial zoonótico de esta infección parasitaria. Es necesario muestrear las provincias restantes para establecer el alcance de la diseminación del parásito a lo largo del tiempo.

Estos estudios son esenciales para la implementación de las estrategias de vigilancia y control que reduzcan el riesgo de angiostrongiliasis entre los residentes locales y limiten la aparición de nuevos focos (47).

En los brotes reportados al Ministerio de Salud se ha involucrado el consumo de caracoles *A. fulica* y *Pomacea* spp. crudos, y si bien en su momento se lanzaron campañas locales destinadas a evitar dicho consumo, hace varios años que no se hacen actividades de promoción de salud.

En Ecuador, el consumo de caracoles crudos o poco cocidos no es habitual; se consumen caracoles (‘churos’) en ciertas celebraciones indígenas, pero en estudios hechos en dichos caracoles por el CRNP del INSPI (datos no publicados) no se detectó infección, presumiblemente por la altura en que se encuentran.

A diferencia de lo que sucede en los países asiáticos, como China y Tailandia, el consumo de caracoles no constituye una comida étnica o típica de ninguna de las provincias donde se han encontrado huéspedes intermediarios y definitivos infectados y casos de infección en humanos.

Esta parasitosis transmitida por alimentos presenta una gran incidencia en los países asiáticos debido a factores culturales (consumo de moluscos) que no están presentes en nuestro país, lo que explicaría que, a pesar de que en los huéspedes definitivos e intermediarios se han registrado tasas altas de infección, los casos humanos se presentan esporádicamente.

No se cuenta con una prueba serológica que permita detectar la presencia de anticuerpos, por lo que el diagnóstico sigue siendo clínico y epidemiológico. También hay que tener presente la variedad de presentaciones clínicas de la infección, que van desde un ligero malestar a una meningitis eosinofílica, por lo que la presencia de casos no diagnosticados debe siempre considerarse.

## Referencias

1. Eamsobhana P. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* - a neglected disease with escalating importance. Trop Biomed. 2014;31:569-78.
2. Martini RL. Diseño de un programa de control y prevención de *Angiostrongylus cantonensis* en el Ecuador período 2008-2009. Guayaquil: Universidad Estatal de Guayaquil; 2011. p. 1-19.
3. Chen TH. Un nouveau nématode pulmonairé: *Pulmonema cantonensis* n. g. n. sp., de rats de Cantón. Ann Parasitol Hum Comp. 1935;13:321-7.

4. Aguiar PH, Morera P, Pascual J. First record of *Angiostrongylus cantonensis* in Cuba. Am Trop Med Hyg. 1981;30:963-5. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1981.30.963
5. Kliks M, Palumbo N. Eosinophilic meningitis beyond the Pacific Basin: the global dispersal of a peridomestic zoonosis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the nematode lungworm of rats. Soc Sci Med. 1992;34:199-212.
6. Kwon E, Ferguson T, Park S, Manuzak A, Qvarnstrom Y, Morgan S, *et al*. A severe case of *Angiostrongylus* eosinophilic meningitis with encephalitis and neurologic sequelae in Hawai'i. Hawaii J Med Public Health. 2013;72(Suppl.2):41-5.
7. Beaver PC, Jung R, Cupp EW. Beaver's Clinical Parasitology. Ninth edition. Philadelphia: Lea and Febiger; 1984. p. 292-4.
8. Del Risco U, Dieguez L. Presencia y distribución de hospederos intermediarios de *Angiostrongylus cantonensis* en Camagüey. Prevalencia e importancia epidemiológica para su control. AMC. 2004; 8(1):1-13.
9. Thiengo S, Fernandez M, Torres E, Coelho P, Lanfredi R. First record of a nematode Metastrongyloidea (*Aelurostrongylus abstrusus* larvae) in *Achatina* (Lissachatina) *fulica* (Mollusca, Achatinidae) in Brazil. J Invert Pathol. 2008;98:34-9. https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.10.010
10. Maldonado A, Simões RO, Oliveira A, Motta E, Fernandez M, Pereira Z, *et al*. Firts report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. Mem Inst Osw Cruz. 2010;105: 938-41. https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000700019
11. Solórzano LF, Martini L, Muzzio J, Hernández H, Sarracent J, Rojas L. *Angiostrongylus cantonensis*: un parásito emergente en Ecuador. Rev Cub Med Trop. 2014;66:20-33.
12. Martini RL, Dorta CA. *Angiostrongylus cantonensis* - Emergencia en América. Primera edición. La Habana: Editorial Academia La Habana; 2016. p. 22-9.
13. Dard C, Piloquet JE, Qvarnstrom Y, Fox LM, M'kada H, Hebert JC, *et al*. First evidence of *Angiostrongyliasis* caused by *Angiostrongylus cantonensis* in Guadeloupe, Lesser Antilles. Am J Trop Med Hyg. 2017;96:692-7. https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0792
14. Barrientos Z. Aspectos básicos sobre la clasificación, recolección, toma de datos y conservación de los moluscos. Revista de Biología Tropical. 2003;51:13-30. https://doi.org/10.15517/rbt.v51i3.26363
15. Muzzio AJ. Moluscos hospederos intermediarios de *Angiostrongylus cantonensis* en dos provincias de Ecuador. La Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2011. p. 28.
16. Wallace GD, Rossen L. Techniques for recovering and identifying larvae of *Angiostrongylus cantonensis* from molluscs. Hawaii: University of Hawaii at Manoa; 1969. p. 427-36.
17. Cowie RH. Biology, systematics, life cycle, and distribution of *Angiostrongylus cantonensis*, the cause of rat lungworm disease. Hawaii J Med Public Health. 2013;72:6-9.
18. Thiengo S, Maldonado A, Mota E, Torres E, Caldeira R, Carvalho OS, *et al*. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. Acta Trop. 2010;115:194-9. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.01.005
19. Ibáñez CA, Berovides V, Hernández N, Cantillo J, De la Fuente J. Relación entre la morfofisiología y la carga de ectoparásitos en dos poblaciones de ratas (*Rattus* sp.) de La Habana. Rev Cubana Med Trop. 2012;64:224-34.
20. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud de Perú. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2008. p. 5-9.
21. Stockdale WH, Slapcinsky J, Roff S, Mendieta CJ, Diaz GZ, Stern J, *et al*. Geographic distribution of *Angiostrongylus cantonensis* in wild rats (*Rattus rattus*) and terrestrial snails in Florida, USA. PLoS One. 2017;12:e0177910. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177910
22. Guerino LR, Pecora IL, Miranda MS, Aguiar-Silva C, Carvalho OS, Caldeira RL, *et al*. Prevalence and distribution of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Angiostrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca, Gastropoda) in Baixada Santista, São Paulo, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2017;50:92-8. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0316-2016
23. Martin-Alonso A, Abreu-Yanes E, Feliu C, Mas-Coma S, Bargues MD, Valladares B, *et al*. Intermediate hosts of *Angiostrongylus cantonensis* in Tenerife, Spain. PLoS One. 2015;10:6-7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120686

24. Apichat V, Raxsina P, Seangchai N, Muncharee T. Survey of *Angiostrongylus cantonensis* in rats and giant African land snails in Phitsanulok province, Thailand. Asian Pac J Trop Med. 2011;4:597-9. https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60154-5

25. Simões RO, Maldonado A, Olifiers N, García SJ, Bertolino FA, Luque LJ. A longitudinal study of *Angiostrongylus cantonensis* in an urban population of *Rattus norvegicus* in Brazil: The influences of seasonality and host features on the pattern of infection. Parasit Vectors. 2014;7:100. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-100

26. Wang Q, Lai D, Zhu X, Chen X, Lun Z. Human angiostrongyliasis. Lancet Infect Dis. 2008;8:621-30. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70229-9

27. Jarvi SI, Quarta S, Jacquier S, Howe K, Bicakci D, Dasalla C, *et al*. High prevalence of *Angiostrongylus cantonensis* (rat lungworm) on eastern Hawaii Island: A closer look at life cycle traits and patterns of infection in wild rats (*Rattus* spp.). PLoS One. 2017;12:e0189458. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189458

28. Monte TC, Simões RO, Oliveira AP, Novaes CF, Thiengo SC, Silva AJ, *et al*. Phylogenetic relationship of the Brazilian isolates of the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* (nematoda: metastrongylidae) employing mitochondrial COI gene sequence data. Parasit Vectors. 2012;6:248-56. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-248

29. Carvalho Odos S, Scholte RG, Mendonça CL, Passos LK, Caldeira RL. *Angiostrongylus cantonensis* (nematode: metastrongyloidea) in molluscs from harbor areas in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107:740-6. https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000600006

30. Tokiwa T, Harunari T, Tanikawa T, Komatsu N, Koizumi N, Tung KC, *et al*. Phylogenetic relationships of rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, isolated from different geographical regions revealed widespread multiple lineages. Parasitol Int. 2012;61:431-6. https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.02.005

31. Wang QP, Wu ZD, Wei J, Owen RL, Lun ZR. Human *A. cantonensis*: An update. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:389-95. https://doi.org/10.1007/s10096-011-1328-5

32. Hammoud A, Nayes R, Murphy LS, Heresi RJ, Butler PG, Pérez JI, *et al*. *Angiostrongylus cantonensis* meningitis and myelitis, Texas, USA. Emerg Infect Dis. 2017;23:1037-8. https://doi.org/10.3201/eid2306.161683

33. Eamsobhana P, Yoolek A, Punthuprapasa P, Yong H. Effect of Thai 'koi-hoi' food flavoring on the viability and infectivity of the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). Act Trop. 2009;113:245-7. https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0191

34. Ewers EC, Anisowicz SK. The potential danger of eating wild lettuce: A brief review of human rat lungworm infection. Hawaii J Med Public Health. 2014;73:28-32.

35. Cowie RH. *Angiostrongylus cantonensis*: agent of a sometimes fatal globally emerging infectious disease (rat lungworm disease). ACS Chem Neurosci. 2017;8:2102-4. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00335

36. Thiengo SC, Simões OR, Fernandez MA., Maldonado A. *Angiostrongylus cantonensis* and rat lungworm disease in Brazil. Hawaii J Med Public Health. 2013;72:18-22.

37. Morassuti AL, Thiengo SC, Fernandez M, Sawanyawisuth K, Graeff-Teixeira C. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109:399-407. https://doi.org/10.1590/0074-0276140023

38. Valente R, Robles M, Navone TG, Diaz IJ. *Angiostrongylus* spp. in the Americas: Geographical and chronological distribution of definitive hosts versus disease reports. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018;113:143-52. https://doi.org/10.1590/0074-02760170226

39. Spratt DM. Species of *Angiostrongylus* (Nematoda: Metastrongyloidea) in wildlife: A review. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2015;4:178-89. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.02.006

40. Tseng YT, Tsai HC, Sy CL, Lee SS, Wann SR, Wang YH, *et al*. Clinical manifestations of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: 18 years' experience in a medical center in southern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. 2011;44:382-9. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2011.01.034

41. Defo AL, Lachaume N, Cuadro-Alvarez, E, Maniassom C, Martin E, Njuieyon, *et al*. *Angiostrongylus cantonensis* infection of central nervous system, Guiana Shield. Emerg Infect Dis. 2018;24:1153-5. https://doi.org/10.3201/eid2406.180168

42. Eamsobhana P. Angiostrongyliasis in Thailand: Epidemiology and laboratory Investigations. Hawaii J Med Public Health. 2013;72:28-32.

43. Hu X, Du J, Tong C, Wang S, Liu J, Li Y, *et al*. Epidemic status of *Angiostrongylus cantonensis* in Hainan island, China. Asian Pac J Trop Med. 2011;4:275-7. https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60085-0

44. Li YC, Hu XM, Tong CJ, Liu J, Li MT, Wang SQ. Investigation on serology, risk factor and awareness of *Angiostrongylus cantonensis* in Hainan province. Chinese journal of parasitology & parasitic diseases. 2011;29:74-5.

45. Zhang Y, Huang D, Tan QM, Chen DX, Zhan XM. Epidemiological investigation of *Angiostrongylus cantonensis* in Jiangmen of Guangdong Province. Chinese journal of parasitology & parasitic diseases. 2008;26:370-3.

46. Pincay T, García L, Narváez E, Decker O, Martini L, Moreira J. Angiostrongylosis due to *Parastrongylus cantonensis* in Ecuador. First report in South America. Trop Med Int Health. 2009;14 37.

47. Lv S, Zhang Y, Liu HX, Hu L, Yang K, Steinmann P, *et al*. Invasive snails and an emerging infectious disease: Results from the First National Survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3:4-6. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000368

48. Himsworth CG, Parsons KL, Jardine C, Patrick DM. Rats, Cities, people, and pathogens:A systematic review and narrative synthesis of literature regarding the ecology of rat-associated zoonoses in urban centers. Vector Borne Zoonotic Dis. 2013;13:1-11. https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1195

Biomédica 2019;39:385-404
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4536

Artículo original

# Validación de la sexta edición del *Addiction Severity Index* (ASI-6) (ISA-6) en población clínica de Colombia

Juan Pablo Zapata[1], Jenny García[1,2], César Augusto Arroyave[2], Juan Daniel Calderón[2], José Mario Gómez[3], Doris Jacqueline Buitrago[3], Angélica Aparicio[4], Daniel Camilo Aguirre[1]

[1] Grupo Académico de Epidemiología Clínica, GRAEPIC, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[2] Clínica Samein S.A.S., Medellín, Colombia
[3] Centro de Atención a Drogodependencias, Hospital Universitario San Vicente Fundación, Medellín, Colombia
[4] Corporación Cardynal y Fundación Camino a la Vida, Medellín, Colombia

**Introducción.** Se recomienda el uso del *Addicition Severity Index* en su sexta versión (ASI-6) para establecer las necesidades del paciente con adicciones y evaluar la efectividad de los programas.
**Objetivo.** Desarrollar una versión para Colombia del ASI-6 garantizando la equivalencia translingüística y transcultural, y evaluar su confiabilidad y la validez de constructo.
**Materiales y métodos.** En el estudio se incluyeron adultos con trastornos debidos al uso de sustancias bajo tratamiento en centros de atención de la drogodependencia. Se adaptó la versión en español con base en la original en inglés y, posteriormente, se tradujo al inglés la versión así adaptada para determinar su equivalencia. Se evaluó la confiabilidad en cuanto a la consistencia interna, así como la reproducibilidad prueba-reprueba y la confiabilidad interevaluador. La validez convergente del constructo se comprobó mediante la correlación con cuestionarios que miden constructos similares a los subyacentes a cada subescala del ISA-6.
**Resultados.** Se encontró una consistencia interna adecuada, con un alfa de Cronbach por encima de 0,7 en todas las subescalas, excepto la "Social" (α=0,66). La confiabilidad entre evaluadores y de la prueba-reprueba fueron altas, con coeficientes de correlación intraclase mayores de 0,7 en todas las subescalas. El aspecto convergente de la validez de constructo se demostró al obtener coeficientes de correlación de Spearman entre 0,53 y 0,88 en las subescalas del ISA-6 comparadas con cuestionarios que miden constructos similares.
**Conclusión.** La versión del ISA-6 adaptada al contexto colombiano evidenció una confiabilidad y una validez de constructo adecuadas, por lo que puede introducirse en la clínica, aunque se requieren estudios para conocer su sensibilidad al cambio y su validez estructural.

**Palabras clave:** trastornos relacionados con sustancias; drogas ilícitas; consumidores de drogas; estudios de validación; psicometría.

**Validation of the sixth version of the Addiction Severity Index (ASI-6) for patients in a clinical population of Colombia**

**Introduction:** The Addiction Severity Index (ASI-6) is recommended for identifying the needs of addicted patients and assessing the effectiveness of a program.
**Objective:** To develop a version of the ASI-6 suitable for Colombia and trans-linguistically and trans-culturally equivalent to the original. Additionally, this study also sought to assess the reliability and construct validity of the resulting version.
**Materials and methods:** The study included Colombian adults with harmful substance use or dependence syndrome who were being treated at drug addiction centers. The original English version underwent a cultural adaptation process. The scale was translated and back-translated to assess its equivalence. Reliability was assessed in terms of internal consistency and interrater and test-retest reliability. The convergent aspect of the construct validity was assessed via the correlation of the instrument with other scales measuring similar underlying constructs.
**Results:** We found an adequate internal consistency for the subscales of the ASI-6 for its Cronbach´s alpha coefficient was above 0.7 with the exception of the social problems subscale (α=0.66). In addition, interrater and test-retest reliability was high, since their intraclass correlation coefficient (ICC) was above 0.7 for all the subscales. Construct validity was demonstrated by a Spearman correlation coefficient ranging from 0.53 to 0.88 between the ASI-6 subscales and other similar scales.
**Conclusion:** The version of the ASI-6 adapted to the Colombian context was found to have good reliability and validity, thus it can be introduced into clinical practice. However, additional studies are needed to evaluate its responsiveness and structural validity.

**Keywords:** Substance-related disorders; street drugs; drug users; validation studies; psychometrics.

**Recibido:** 08/06/18
**Aceptado:** 17/10/18
**Publicado:** 17/10/18

**Citación:**
Zapata JP, García J, Arroyave CA, Calderón JD, Gómez JM, Buitrago DJ, Aparicio A, Aguirre DC. Validación de la sexta edición del *Addiction Severity Index* (ISA-6) en población clínica de Colombia. Biomédica. 2019;39:385-404.
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4536

**Correspondencia:**
Juan Pablo Zapata, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Carrera 51d N° 62-29, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 219 6060; fax: (574) 263 8282
juanp.zapata@udea.edu.co

**Contribución de los autores:**
Juan Pablo Zapata, Jenny García, Daniel Camilo Aguirre: concepción y diseño de la investigación y análisis de datos
Juan Pablo Zapata, Jenny García, César Augusto Arroyave, Doris Jacqueline Buitrago: adaptación cultural del instrumento y evaluación de pacientes
Juan Daniel Calderón y Angélica Aparicio: evaluación de pacientes
José Mario Gómez: adaptación cultural del instrumento
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

**Financiación:**
Este trabajo fue financiado por el Grupo Académico de Epidemiología Clínica (GRAEPIC) y la Clínica Samein S.A.S.

**Conflicto de intereses:**
Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

La adicción a sustancias es un trastorno mental complejo que se caracteriza por el consumo compulsivo de drogas a pesar de los esfuerzos por abstenerse y de las consecuencias negativas que tiene en el individuo y en su entorno (1).

Según el Informe Mundial sobre las Drogas 2017, publicado por la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), se estima que 250 millones de personas entre los 15 y los 64 años consumieron drogas ilícitas en el 2015, lo que corresponde a una prevalencia anual global de 5,3 %. De ellos, cerca de 29,5 millones presentaban un trastorno por el uso de sustancias, o dependencia, lo cual equivaldría a una prevalencia global de 0,6 % (2).

Según los datos del Estudio Nacional de Consumo de Sustancias Psicoactivas 2013, en Colombia la prevalencia del consumo de cualquier sustancia ilícita durante el año anterior en personas entre los 12 y los 65 años fue de 3,6 %, siendo la mayor la del grupo de 18 a 24 años (3). Se estimó que en el 57,7 % de los consumidores el uso de las sustancias era perjudicial, lo que indica que por lo menos uno de cada dos consumidores en Colombia presentaba algún problema derivado del consumo. Los departamentos con la mayor prevalencia fueron Antioquia (especialmente Medellín y el Área Metropolitana), Quindío y Risaralda.

El impacto generado por la adicción va más allá del terreno médico, lo que explica que se la considere un problema social y político (4). En el individuo se producen alteraciones en su salud física y mental que muy posiblemente aumentan la demanda y los costos de los servicios de salud (5).También se presenta un aumento en la mortalidad que, junto con la morbilidad, implican una carga alta de enfermedad para la sociedad; de hecho, es una de las primeras cinco causas de años de vida ajustados por discapacidad (6). Asimismo, la adicción ha sido relacionada con múltiples acciones ilegales, como la delincuencia y el crimen organizado (7). Además, en las familias de los individuos con adicción hay un mayor riesgo de violencia intrafamiliar y maltrato (8). Es decir, la adicción repercute en el individuo y en el colectivo, de ahí que se considere una prioridad en salud pública.

La actual estrategia mundial de la UNODC para promover políticas de tratamiento éticas y basadas en la evidencia recibe el nombre de *Treatnet* (9), y con ella se promueve la individualización del tratamiento en función de las necesidades del sujeto. Para lograrlo, se recomienda el uso sistemático del *Addiction Severity Index* (ASI), el cual evalúa las diferentes dimensiones que resultan afectadas por el trastorno (10). La versión más reciente es la sexta, la cual ofrece la ventaja de reducir el tiempo de aplicación, pues en el inicio de cada área se incluyen preguntas de tamización (11). Esta versión ya ha sido validada en España y Brasil y se ha encontrado que tiene buenas propiedades psicométricas (12,13).

En Colombia se ha utilizado la primera versión de este instrumento en diferentes instituciones desde 1985 tras un proceso de adaptación realizado en el Hospital Mental de Antioquia en el que no se evaluaron sus propiedades psicométricas (14), lo cual es fundamental dada la influencia del medio cultural en la aplicación de la escala. En las adicciones, la comprensión de algunas conductas y la interpretación de la consecuencias derivadas del consumo deben hacerse a la luz de la cultura en la que se inscriben (15). Asimismo, la formulación de las preguntas y la denominación de las sustancias pueden afectar la comprensión de la escala por parte del examinado y llegar a producir errores de medición (16). Un instrumento confiable y válido es esencial para caracterizar a los pacientes que consultan.

El objetivo de este estudio fue desarrollar una versión para Colombia de la sexta edición del ASI (ASI-6) que tuviera equivalencia translingüística y transcultural con respecto a la original, así como evaluar la confiabilidad y la validez de constructo en pacientes adultos con diagnóstico de adicción atendidos en centros de atención de las drogodependencias.

## Materiales y métodos

Se hizo un estudio multicéntrico de validación del cuestionario, el cual se ajustó a las disposiciones de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia y de la Declaración de Helsinki de 2013 y fue aprobado por los comités de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia y de las instituciones participantes.

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes. Se solicitó la autorización para la utilización del cuestionario a sus autores, al Ministerio de Salud de Colombia y a la representante para Colombia de la UNODC.

### *Participantes*

Se incluyeron pacientes que asistían a los centros de atención de las drogodependencias de la Clínica Samein S.A.S y del Hospital San Vicente Fundación, los cuales atienden a afiliados del régimen contributivo y del subsidiado, así como a los servicios terapéuticos de la Corporación Cardynal y la Fundación Camino a la Vida, que atienden a usuarios particulares de diferentes municipios de Antioquia.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: ser de nacionalidad colombiana, tener más de 18 años, tener un consumo perjudicial de sustancias o un síndrome de dependencia a sustancias psicotrópicas, según los criterios de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10), y estar recibiendo asistencia médica para abandonar el consumo de dichas sustancias.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: haber sido diagnosticado con retraso mental moderado o grave, o con demencia, ser analfabeta y tener exclusivamente consumo perjudicial o síndrome de dependencia al tabaco.

Se llevó a cabo un muestreo no probabilístico de manera secuencial incluyendo a los pacientes que cumplían los criterios de elegibilidad y estaban dispuestos a participar.

Se calcularon los respectivos tamaños de muestra para cada propiedad psicométrica. Para garantizar la consistencia interna, se calculó un tamaño de muestra de 98 participantes utilizando las fórmulas propuestas por Bonett (17), con un error de tipo I de 0,05, un valor esperado para el alfa de Cronbach de 0,7, y una amplitud del intervalo de confianza de 0,2, teniendo en cuenta que la subescala con el menor número de ítems tiene cuatro.

En cuanto a la confiabilidad entre evaluadores, se calculó un tamaño de muestra de 63 participantes utilizando la fórmula para medir la reproducibilidad (18) y asumiendo un error de tipo I de 0,05, uno de tipo II de 0,20, un coeficiente de correlación intraclase (CCI) especificado en la hipótesis nula de 0,5 y uno para la hipótesis alterna de 0,7, y para dos evaluadores.

Para la confiabilidad prueba-reprueba, se calculó un tamaño de muestra de 41 participantes con un error de tipo I de 0,05, un poder de 0,80, un CCI de 0,7 y un nivel de precisión de 0,2, utilizando la fórmula basada en la amplitud del intervalo de confianza (19).

Para la validez convergente se calculó un tamaño de muestra de 65 sujetos utilizando la fórmula de correlación (20) con un error de tipo I de 0,05, un poder de 0,80 y una prueba de hipótesis a una cola en la que el coeficiente de correlación de Spearman para la población fue de 0,5 en la hipótesis alterna y de 0,1 en la hipótesis nula.

### *Adaptación cultural*

Se utilizaron las versiones en el idioma original y la validada en España, las cuales fueron facilitadas por los grupos de la Universidad de Pennsylvania y la Universidad de Oviedo. Se siguieron los lineamientos de la *International Test Commission* (21) y se formó un comité de psiquiatras hablantes nativos del español, con conocimientos lingüísticos, y expertos en el tema de la validación de cuestionarios y en adicciones, quienes leyeron de forma independiente cada una de las preguntas de las versiones en inglés y español, señalando los términos que podían ser confusos para la población colombiana y proponiendo cambios. Asimismo, se anotaron los términos coloquiales para referirse a cada una de las sustancias que aparecen en la lista de alcohol y drogas del cuestionario.

Se discutió y se redactó cada una de las preguntas considerando entre los principales cambios la adopción de la sigla “ISA” para el cuestionario, dado que está ampliamente difundida, a pesar de que la traducción al español de la palabra *severity* sería ‘gravedad’. También se ajustaron el nivel educativo (básica primaria, secundaria, media, técnica, profesional y posgrado) y se incluyó la Clasificación Internacional Uniforme de Ocupaciones adaptada para Colombia (CIUO) – 08 AC (22). Para los ajustes de la subescala “Legal” se contó con la asesoría de dos abogados, ya que las preguntas sobre delitos debían adaptarse al sistema penal colombiano.

La versión preliminar fue traducida al inglés por un traductor que desconocía el cuestionario original y esta versión en inglés se comparó con la original para detectar los ítems disímiles, los cuales fueron discutidos por el comité. No se encontraron cambios sustanciales en las frases, por lo que no fue necesaria una nueva traducción. Se redactó, entonces, una versión del cuestionario previa a la definitiva.

### *Prueba piloto*

Esta se hizo en un grupo de 15 adultos con adicciones utilizando la versión previa del ISA-6. Se les solicitó que señalaran los ítems que no entendieran, que explicaran cómo entendían las preguntas en los ítems utilizados para calcular los puntajes y que describieran las dificultades que podría tener una persona para entender la escala. La mayoría de los participantes consideró que ninguno de los ítems era difícil de entender o irrelevante. El formato de la escala se ajustó con la señalización de los “saltos” de pregunta a pregunta.

Con estas adaptaciones, se obtuvo la versión final del ISA-6. Se elaboró el manual de uso, en el cual se describieron los procedimientos necesarios para la formulación de las preguntas y su calificación teniendo en cuenta dichas adaptaciones y el manual disponible en inglés.

### *Procedimientos*

Un psiquiatra experto en el tema de adicciones, con certificación en la estrategia *Treatnet*, capacitó a los miembros del equipo de investigación y cada uno recibió el manual de uso para revisarlo sección por sección.

Todos los sujetos que asistían a consulta o estaban internados en los centros participantes fueron evaluados por un psiquiatra para comprobar su elegibilidad y que hubieran recibido una explicación y hubieran firmado el consentimiento informado; después, se les hizo la entrevista con el ISA-6 en un consultorio disponible en la institución.

Las siguientes son las definiciones de los términos pertinentes empleados en el estudio.

*Consistencia interna.* Se entiende como el grado en el que se correlacionan los ítems que conforman una escala (23). Se estimó la consistencia interna de cada subescala, dado que se trataba de un cuestionario de múltiples dimensiones en el que las subescalas son independientes entre sí (24-26) y cada ítem se relaciona únicamente con la variable latente de la correspondiente subescala.

*Confiabilidad entre evaluadores.* Mide el grado de concordancia entre los puntajes de los pacientes evaluados por diferentes personas (23). Por ello, un subgrupo de los participantes fue evaluado por dos psiquiatras entrenados: uno de ellos dirigía la entrevista y el otro calificaba cada uno de los ítems de forma independiente, roles que intercambiaban a lo largo del estudio. Se decidió hacerlo de forma simultánea porque en los artículos consultados se ha reportado que la entrevista dura aproximadamente una hora (27), lo que podría afectar la participación de los individuos evaluados.

*Confiabilidad prueba-reprueba.* Mide el grado de correlación de los puntajes obtenidos en el cuestionario en dos momentos diferentes de tiempo, sin que se haya presentado variación en el constructo, en este caso, la gravedad de la adicción (23). Para ello, el mismo investigador que había hecho la primera entrevista hizo de nuevo aquellas preguntas de los ítems del ISA-6 que otorgan puntaje en el curso de los siete días posteriores a la primera entrevista, dado que se consideró que no se observarían cambios significativos en el estado clínico de las personas en lo tocante a las adicciones, y que la probabilidad de que el paciente y el entrevistador recordaran las respuestas sería menor.

*Validez de constructo.* Es el grado en el cual el cuestionario mide el constructo pertinente (23). Dada la ausencia de un patrón de referencia para la gravedad de la adicción, las hipótesis se probaron con respecto a dos aspectos. Primero, el convergente, en el que se asumió que los puntajes del ISA-6 se correlacionaban con los de otros cuestionarios que miden constructos similares (28) y que fueron empleados en una primera entrevista con un subgrupo de participantes. Se esperaba encontrar relación entre las subescalas de “Salud física” del ISA-6 y el resumen del componente físico (*Physical Summary Component*, PSC) del Cuestionario de Salud de 12 ítems (*Short Form 12 Health Survey*, SF-12); entre la “Psiquiátrica” y el resumen del componente mental (*Mental Summary Component*, MSC) de este mismo cuestionario; entre la subescala “Empleo” y el dominio “Trabajo” del Cuestionario para evaluación de la discapacidad de la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization Disability Assessment Schedule,* WHODAS 2.0); entre la subescala “Social – Problemas” y el dominio de “Relaciones” del WHODAS 2.0, así como entre las subescalas “Alcohol” y “Drogas” del ISA-6 y el *Short Inventory of Problems* (SIP), y, por último, entre la subescala “Legal” y los “Criterios diagnósticos de personalidad antisocial” del Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (*Diagnostic and Statistical Manual* of *Mental Disorders*, DSM-5).

En cuanto al aspecto discriminatorio o divergente, se evaluó si los puntajes del ISA-6 tenían una relación nula o baja con los puntajes de cuestionarios que evalúan un constructo diferente (28). En todas las subescalas se evaluó la correlación con el puntaje del dominio "Movilidad" del WHODAS 2.0, en el cual se miden las dificultades para actividades como ponerse de pie, moverse dentro de la casa y caminar distancias. Se escogió este dominio porque se ha comprobado que la adicción tiene poco efecto en él (29).

***Instrumentos de medición***

*Addiction Severity Index* (ISA-6). Es una escala diseñada por un grupo de investigadores de la Universidad de Pennsylvania de Estados Unidos, que se aplica mediante entrevista semiestructurada y evalúa las alteraciones en las áreas de la vida del individuo que resultan afectadas por la adicción.

En esta escala el concepto de gravedad equivale a la necesidad de tratamiento adicional. La sexta edición se publicó en el 2006 y ofrece la ventaja de reducir el tiempo de la entrevista, pues al inicio de cada área hay "saltos", o preguntas de tamización, que, en caso de ser negativas, permiten continuar con la siguiente (30). Asimismo, aporta información sobre problemas en dichas áreas en los treinta días anteriores a la entrevista y a lo largo de la vida, pero, a diferencia de las versiones anteriores, incluye un puntaje para los últimos seis meses, período que se considera apropiado para los análisis económicos (11).

En cada subescala se explora el efecto del consumo y se registran datos relevantes para la historia clínica de ingreso. Con algunas de las preguntas se calculan los puntajes. En la subescala de "Salud física" se puntúan la percepción de la salud física del paciente, los días que ha presentado algún problema de salud física, la preocupación que este genera y la necesidad de tratamiento. La subescala de "Empleo" se califica a partir de la situación laboral del paciente en el momento de la entrevista, el dinero devengado en el último mes, los días que ha trabajado con remuneración y aquellos en que ha presentado problemas en el trabajo. Las de "Alcohol" y "Drogas" son subescalas que evalúan el consumo en el mes anterior, los problemas derivados de dicho consumo, el dinero gastado y la preocupación por el tratamiento y la importancia que el paciente le da. La subescala "Legal" puntúa los días de participación en actividades ilegales. La "Social" califica la relación con niños ("Social – Niños"), la percepción de apoyo por parte de la pareja, la familia y los amigos ("Social – Apoyo") y la presencia de problemas en las relaciones ("Social – Problemas"). En la subescala "Estado psiquiátrico" se determinan los días en que el sujeto ha presentado problemas psicológicos y la imposibilidad subsiguiente de realizar actividades, así como la molestia que generan y la importancia que otorga el paciente a su tratamiento. Las respuestas de naturaleza cuantitativa con nivel de medición de razón se convierten a un nivel de intervalo, según las indicaciones del grupo que desarrolló el cuestionario.

Con esta información, se calcula un puntaje crudo para cada subescala que luego se transforma en un puntaje T, siguiendo, también en este caso, los lineamientos de los autores de la escala (11). Al final, el evaluador califica la confiabilidad del entrevistador: pobre, si la información es inexacta o contradictoria; regular, si el perfil parece razonable, aunque con numerosas inexactitudes aparentes en una o dos áreas, y buena, si el perfil parece ser un buen reflejo del entrevistado o hay pocas inexactitudes. La sexta versión solo ha sido validada en Brasil (12).

*Cuestionario de Salud de 12 ítems (SF-12).* Evalúa de manera genérica la calidad de vida relacionada con la salud y permite calcular dos medidas de resumen del estado de salud: el CSC y el MSC. Dichas medidas indican la funcionalidad física y mental del individuo y los puntajes bajos indican una menor calidad de vida. De ahí que se espere una correlación negativa moderada con los puntajes de gravedad de las subescalas de "Salud física" y "Psiquiátrica" del ISA-6. Se escogió porque el marco de referencia temporal es el momento actual (últimas cuatro semanas) y proporciona una medida de la salud física y mental percibida por el mismo sujeto con adicción. También se ha demostrado su concordancia con el SF-36 en población adicta en terapia de suplencia con metadona (31) y se ha empleado en validaciones del ISA-6 (11,12). Esta escala se validó en Colombia y se ha comprobado que tiene adecuadas propiedades psicométricas (32,33).

*Cuestionario para la evaluación de la discapacidad de la Organización Mundial de la Salud (WHODAS 2.0).* Es un instrumento genérico para la evaluación de la salud y la discapacidad (34). Evalúa la capacidad del paciente para desempeñar actividades en seis dominios diferentes en los 30 días anteriores. Se ha comprobado que tiene buenas propiedades psicométricas en pacientes con trastornos psiquiátricos (35,36) y se lo ha propuesto para calificar su funcionalidad (37,38). En pacientes con adicciones se ha encontrado una mayor discapacidad en todos los dominios en comparación con la población general (39), aunque el menos afectado es el de la movilidad (29). Se utilizó el dominio de "Relaciones interpersonales" y se esperaba una correlación positiva moderada con la subescala "Social – Problemas" del ISA-6, así como una correlación positiva moderada entre el dominio "Trabajo" y la subescala "Empleo"; por último, se utilizó el dominio de "Movilidad", con el que se esperaban correlaciones nulas o bajas con todas las subescalas del ISA-6.

*Short Inventory of Problems (SIP).* Es un cuestionario que diligencia la propia persona y que inquiere sobre la frecuencia de diversas consecuencias del uso del alcohol y las drogas en el mes anterior. Los puntajes altos reflejan una mayor frecuencia de los problemas relacionados con el consumo. En los estudios de validación de su versión original en inglés y de la traducción al español, se ha encontrado que su confiabilidad y validez son buenas (40-42). Este instrumento se ha utilizado para la validación de varias versiones del ISA (25,26). En este estudio se esperaban correlaciones positivas moderadas entre el puntaje del SIP y el puntaje de las subescalas de "Alcohol" y "Drogas" del ISA-6.

*Criterios diagnósticos de personalidad del DSM-5.* Se evaluaron los criterios diagnósticos del trastorno de personalidad antisocial del DSM-5, específicamente los siete indicadores del criterio A (A1-A7), que corresponden a situaciones y patrones de conducta que sugieren la violación y la despreocupación por los derechos de los demás y que, con frecuencia, llevan a la formulación de cargos en procesos legales (37). Se esperaba una correlación positiva moderada entre el número de indicadores del criterio A y el puntaje de la subescala "Legal" del ISA-6.

### *Análisis estadístico*

Las características sociodemográficas y clínicas de los participantes se resumieron mediante procedimientos de estadística descriptiva: frecuencias y porcentajes para las variables categóricas, y medianas y rangos intercuartílicos para las variables continuas (dado que no seguían una distribución normal según la prueba de Shapiro-Wilk con valores de

p<0,05 para todas). Asimismo, se presentaron medidas de tendencia central y de posición de las puntuaciones en cada subescala. Se evaluó si había un efecto piso o un efecto techo cuando más del 15 % de los pacientes alcanzaban la mínima o la máxima puntuación posible, respectivamente (43).

En cuanto a la consistencia interna, se calculó el alfa de Cronbach y se le consideró adecuado si los valores fluctuaban entre 0,7 y 0,9 (44). Para la confiabilidad entre evaluadores y la de prueba-reprueba, se calculó el CCI del tipo de acuerdo absoluto entre las puntuaciones de cada subescala del ISA-6 en las dos mediciones, con sus respectivos intervalos de confianza del 95 % ($IC_{95\%}$), y se consideró como apropiada una correlación con valores mayores de 0,7 (43). Asimismo, se hizo el gráfico de Bland y Altman y se establecieron los límites de acuerdo para la confiabilidad prueba-reprueba.

Para evaluar la validez convergente, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman (r), con sus respectivos valores de p; se esperaba que este arrojara valores por encima de 0,5, lo que indica correlaciones moderadas, en tanto que para la validez divergente se esperaba un valor de r menor de 0,3, es decir, una correlación baja (45). En todos los análisis se utilizó el programa estadístico para ciencias sociales IBM SPSS™, versión 23.

## Resultados

### *Características de la muestra*

Se incluyeron 153 sujetos con adicciones, la mayoría de ellos hombres en la cuarta década de la vida, solteros, y una mediana de escolaridad de 11 años (cuadro 1). El 91,59 % de la muestra pertenecía al régimen contributivo del sistema de salud. Entre las mujeres había una embarazada.

En cuanto a la situación laboral, más de la mitad de los sujetos incluidos no estaba trabajando en el momento de la evaluación; entre quienes trabajaban, el 70,4 % no refirió haber tenido problemas relacionados con el trabajo en ninguno de los días.

En la esfera legal, el 42,2 % de los participantes admitió haber sido arrestado alguna vez en la vida, y el 16,3 % refirió haber participado en actividades ilegales durante el mes anterior.

En cuanto a la situación social, cerca de un tercio de los pacientes convivía con menores de 18 años, y de ellos, el 9,15 % percibía algún grado de dificultad en la relación con los niños. El 63,4 % reportó haber tenido problemas en la relación con la pareja, la familia o los amigos y en el 18,3 % de los casos, las interacciones con ellos habían terminado en golpes o tirando objetos.

La decisión de iniciar el tratamiento había recaído en el paciente, la familia o los amigos en el 85 % de los casos. Se incluyeron pacientes con adicción exclusivamente al alcohol (15 %), exclusivamente a drogas (28,8 %) y a ambos (56,3 %). En el cuadro 1 se presentan otras características adicionales de los sujetos de la muestra.

### *Características de la escala*

La entrevista con el ISA-6 duró, en promedio, 46,76 minutos. En el cuadro 2 se presenta el resumen de los puntajes crudos y los trasformados en puntajes T en cada subescala. Se observó un efecto piso en las subescalas

"Legal" y "Social – Niños", pues el 83,7 % de los participantes obtuvo un puntaje crudo de cero en la primera y el 73,9 % en la segunda. No se encontró un efecto techo en esta muestra. En los ítems que permiten el cálculo de los puntajes de cada subescala no se presentaron pérdidas, por lo que no fue necesaria la imputación de datos.

**Cuadro 1.** Características sociodemográficas y clínicas de 153 sujetos con adicciones incluidos en la validación del ISA-6 en Colombia

| Características sociodemográficas y clínicas | Mediana | Rango intercuartílico |
|---|---|---|
| Edad (años) | 33 | 24 a 44 |
| Escolaridad (años) | 11 | 11 a 13 |
| Hospitalizaciones por enfermedad física | 1 | 0 a 3 |
| Días con problemas de salud física en el último mes | 3 | 0 a 8 |
| Hospitalizaciones por trastorno psiquiátricos | 0 | 0 a 1 |
| Días con problemas psicológicos en el último mes | 5 | 0 a 19 |
| Años de consumo regular de alcohol | 5 | 0 a 17,5 |
| Días de uso de alcohol en el último mes | 4 | 2 a 11 |
| Años de consumo regular de drogas | 11 | 7 a 18,5 |
| Días de uso de drogas en el último mes | 15 | 5 a 28 |
| Número de tratamientos para adicciones | 2 | 1 a 3 |
| | **Frecuencia** | **Porcentaje** |
| Sexo | | |
| Masculino | 136 | 88,9 |
| Estado civil | | |
| Soltero | 87 | 56,9 |
| Unión libre/casado | 40 | 26,1 |
| Separado/divorciado | 24 | 15,7 |
| Viudo | 2 | 1,3 |
| Situación laboral | | |
| Empleado | 71 | 46,4 |
| Salud física | | |
| Antecedente de comorbilidad médica | 56 | 36,6 |
| Esfera legal | | |
| Relata arresto alguna vez en la vida | 63 | 41,2 |
| Situación social | | |
| Ha vivido con niños en el último mes | 53 | 34,6 |
| Percibe ayuda en su red social | 152 | 99,4 |
| Reporta problemas de relación | 97 | 63,4 |
| Modalidad de tratamiento de adicciones | | |
| Residencial | 47 | 30,7 |
| Ambulatorio | 67 | 43,8 |
| Consulta externa | 39 | 25,5 |
| Sustancia principal | | |
| Alcohol | 39 | 25,5 |
| Marihuana | 37 | 24,2 |
| Cocaína | 67 | 43,8 |
| Heroína | 5 | 3,3 |
| Otras | 5 | 3,3 |
| Fiabilidad | | |
| Buena | 111 | 72,5 |
| Regular | 35 | 22,9 |
| Pobre | 7 | 4,6 |

**Cuadro 2.** Puntajes crudos y transformados en puntajes T de 153 sujetos con adicciones en Colombia entrevistados con el ISA-6

| Subescala | Puntaje crudo | | Puntaje T | |
|---|---|---|---|---|
| | Mediana | Rango ontercuartílico | Mediana | Rango intercuartílico |
| Salud física | 8,0 | 3,0 a 12,0 | 45 | 39 a 50 |
| Empleo | 10,8 | 1,6 a 14,6 | 43 | 28 a 53 |
| Alcohol | 6,0 | 3,0 a 15,3 | 50 | 15 a 29 |
| Drogas | 15,0 | 4,0 a 29,4 | 47 | 36 a 53 |
| Legal | 0,0 | 0,0 a 0,0 | 46 | 46 a 46 |
| Social – Niños | 0,0 | 0,0 a 1,0 | 48 | 48 a 56 |
| Social – Apoyo | 14,0 | 11,0 a 15,0 | 69 | 58 a 69 |
| Social – Problemas | 7,0 | 4,0 a 10,0 | 53 | 46 a 60 |
| Psiquiátrica | 15,9 | 8,9 a 23,9 | 46 | 42 a 51 |

### *Consistencia interna*

Se había propuesto un tamaño muestral de 98 sujetos para esta propiedad, pero finalmente se evaluaron 153, pues fue posible hacer la entrevista a un mayor número de participantes. En la mayoría de las subescalas del ISA-6 se encontró una consistencia interna adecuada, con un alfa de Cronbach por encima de 0,7. En ninguna de las subescalas se encontraron valores que sugirieran ítems redundantes. En el cuadro 3 se presentan los valores de este estadístico para cada subescala. En la "Social – Problemas", el alfa de Cronbach obtenido fue ligeramente menor de 0,7.

**Cuadro 3.** Consistencia interna y confiabilidad del ISA-6 en sujetos con adicciones en Colombia

| Subescala | Número de ítems | Consistencia interna (n=153) | Confiabilidad entre evaluadores (n=64) | | Confiabilidad prueba-reprueba (n=45) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Alfa de Cronbach | CCI | $IC_{95}$% | CCI | $IC_{95}$% |
| Salud física | 7 | 0,83 | 0,92 | 0,87-0,95 | 0,71 | 0,52-0,83 |
| Empleo | 4 | 0,89 | 0,98 | 0,97-0,99 | 0,98 | 0,97-0,99 |
| Alcohol | 11 | 0,73 | 0,83 | 0,74-0,89 | 0,78 | 0,63-0,87 |
| Drogas | 12 | 0,90 | 0,93 | 0,88-0,95 | 0,75 | 0,58-0,86 |
| Legal | 6 | 0,74 | 0,97 | 0,95-0,98 | 0,97 | 0,95-0,98 |
| Social – Niños | 5 | 0,70 | 0,98 | 0,97-0,99 | 0,84 | 0,72-0,91 |
| Social - Apoyo | 4 | 0,76 | 0,91 | 0,85-0,94 | 0,84 | 0,74-0,91 |
| Social - Problemas | 5 | 0,66 | 0,98 | 0,97-0,99 | 0,72 | 0,54-0,83 |
| Psiquiátrica | 16 | 0,81 | 0,95 | 0,93-0,96 | 0,85 | 0,73-0,91 |

CCI: coeficiente de correlación intraclase; IC95%: intervalo de confianza del 95 %

### *Confiabilidad entre evaluadores*

Dado que los evaluadores pueden ser fuente de variabilidad, se evaluaron 64 sujetos, uno más de los contemplados inicialmente. Se encontró que los puntajes de todas las subescalas del ISA-6 reflejaban una gran confiabilidad (cuadro 3). El menor CCI se calculó para la subescala "Alcohol", con 0,83, lo que indicaba que el 83 % de la variabilidad total de la puntuación se explicaba por la verdadera variabilidad entre los pacientes con adicción al consumo de alcohol, en tanto que la restante se explicaría por las diferencias entre los dos evaluadores, y por el azar, lo cual se considera adecuado.

### *Confiabilidad prueba-reprueba*

Aunque se planeó evaluarla en 41 participantes, las dos evaluaciones pudieron hacerse en 45 sujetos. Los puntajes obtenidos en dichas evaluaciones reflejaban una confiabilidad alta para todas las subescalas

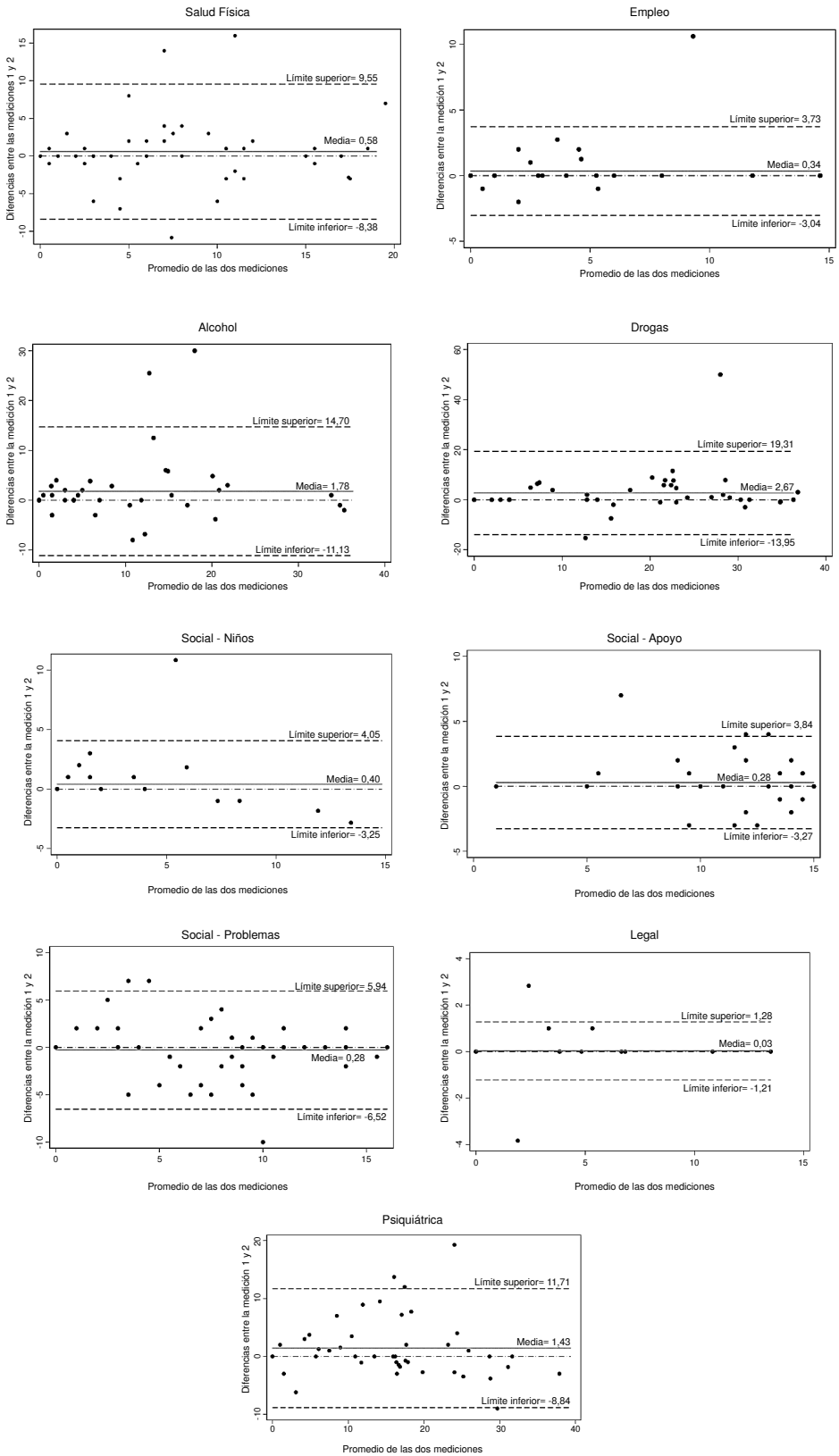



**Figura 1.** Confiabilidad prueba-reprueba del ISA-6. Se muestra el gráfico de Bland y Altman para cada subescala. Las líneas punteadas representan los límites del acuerdo de 95 % (superior e inferior) y la línea continua, la media.

del ISA-6 (cuadro 3), con un CCI que osciló entre 0,71 y 0,98 (subescalas de “Salud física” y “Empleo”, respectivamente). Mediante el gráfico de Bland y Altman (figura 1) fue posible confirmar que el acuerdo entre las dos mediciones era alto y que las diferencias observadas no siguieron un patrón determinado, es decir, podrían deberse más al azar.

### *Validez de constructo*

Aunque inicialmente se calculó una muestra de 64 individuos, fue posible aplicar el ISA-6 y los demás instrumentos a 84 sujetos. Se encontró que cada una de las subescalas del ISA-6 fue válida en cuanto al aspecto convergente del constructo, con correlaciones altas y moderadas indicadas por un valor de ro mayor de 0,5 (cuadro 4).

**Cuadro 4.** Validez de constructo del ISA-6 comparado con otros cuestionarios en 153 sujetos con adicciones en Colombia

| Subescala | SF-12 PSC | WHODAS Empleo | SIP | Anti-social | WHODAS Relación | SF-12 MSC | WHODAS Movilidad |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Salud física | -0,72* | - | - | - | - | - | 0,34* |
| Empleo | - | 0,88* | - | - | - | - | 0,10 |
| Alcohol | - | - | 0,79* | - | - | - | 0,29 |
| Drogas | - | - | 0,74* | - | - | - | -0,12 |
| Legal | - | - | - | 0,57* | - | - | 0,10 |
| Social – Problemas | - | - | - | - | 0,53* | - | 0,15 |
| Psiquiátrico | - | - | - | - | - | -0,85* | 0,14 |

Los valores corresponden al coeficiente de correlación de Spearman (ro).
* Valor de p<0,01

SF-12: *Short Form 12 Health Survey*. PSC: resumen del componente físico. MSC: resumen del componente mental. WHODAS: Cuestionario para la evaluación de discapacidad de la Organización Mundial de la Salud. SIP: *Short Inventory of Problems*

En la subescala de “Salud física” se encontró una elevada correlación negativa con el PSC del SF-12, lo que indica que a mayor gravedad de la adicción, menor la funcionalidad en el componente físico de la calidad de vida.

La subescala “Psiquiátrica” presentó una alta correlación negativa con el MSC del SF-12, lo que sugiere que, tras aumentar la gravedad de los problemas psiquiátricos, disminuyó la percepción de la calidad de vida en cuanto a la funcionalidad mental.

La gravedad en la subescala de “Empleo” medida con el ISA-6 tuvo una elevada correlación positiva con la discapacidad laboral medida mediante el WHODAS 2.0.

Los puntajes de las subescalas de “Alcohol” y “Drogas” tuvieron una elevada correlación positiva con el SIP.

La subescala “Legal” tuvo una correlación positiva moderada con los criterios diagnósticos del trastorno de personalidad antisocial del DSM-5, al igual que la subescala “Social – Problemas” con la discapacidad en las relaciones medida por el WHODAS 2.0.

En cuanto al aspecto divergente, no se encontró correlación entre las subescalas del ISA-6 y la discapacidad generada por la movilidad medida con el WHODAS 2.0, salvo en la subescala de “Salud física”, con una baja correlación positiva (ro=0,34), lo cual sugeriría que al aumentar los problemas físicos, se produciría un discreto aumento en la discapacidad para la ejecución de movimientos y desplazamientos.

## Discusión

Se hizo la adaptación cultural del ISA-6 y se encontró que presentaba una consistencia interna, una confiabilidad entre evaluadores y de prueba-reprueba, así como una validez de constructo, adecuadas.

La mayoría de los participantes eran hombres bachilleres, principalmente entre los 22 y 44 años, y desempleados. Una característica que se evidenció en las medidas de posición (cuartiles) fue la heterogeneidad en las variables medidas en casi todas las subescalas, lo cual indica que se incluyeron sujetos con adicciones de diferente gravedad. Estos rasgos coinciden con los reportes de las características de los pacientes que consultan los centros de atención de las drogodependencias en otros lugares de Colombia (46) y en los sujetos incluidos en los procesos de derivación y validación de la misma versión de la escala (11,12).

Esto resulta ventajoso en la medida en que facilita la comparación de los resultados y permite, según la teoría clásica de los tests, apreciar mejor la confiabilidad de un cuestionario porque se incluyen individuos que responden en diferente grado al constructo (43). No obstante, se observó un efecto piso en las subescalas “Legal” y “Social – Niños”. Podría sugerirse la inclusión de otros ítems en los puntajes para discriminar mejor esta población, pues es probable que este resultado se haya debido a la distribución del rasgo en la muestra, ya que no se incluyeron muchos sujetos que hubieran cometido delitos ni que hubieran convivido con niños en el mes anterior. Esto debe tenerse en cuenta en futuros análisis longitudinales de los puntajes de estas subescalas, pues es probable que, en caso de que los individuos presentaran alguna mejoría, esta no fuera detectable.

En cuanto a la consistencia interna, al igual que en los otros estudios de validación de la misma versión del ISA-6, se encontró que fue adecuada en las subescalas del ISA-6 y fue baja solo en la subescala “Social – Problemas”, lo cual también sucedió en la validación llevada a cabo en Brasil, en la que el alfa de Cronbach para esta subescala fue de 0,64, el más bajo (12). En la validación en España, el grado de consistencia interna estuvo entre 0,85 y 0,95, excepto para las subescalas “Legal” (0,47), “Social-Niños” (0,58) y “Social-Problemas” (0,70) (13).

Una posible explicación de dicho resultado en esta última subescala sería la divergencia entre la presencia de problemas y discusiones con la pareja, los familiares y amigos, que son los ítems que la conforman, en contraste con la preocupación y la importancia del tratamiento para el paciente. Puede ser que el relato de las dificultades no esté ligado a la percepción del tratamiento, o no genere una gran preocupación en los pacientes. En general, los jóvenes tienden a infravalorar el problema de las adicciones y eso influye en su apreciación de los sucesos problemáticos y conlleva una menor preocupación (47).

En los modelos de relaciones sociales con los que se analizan y cuantifican los elementos de la interacción interpersonal, se ha encontrado que la percepción es una fuente de varianza (es decir, lo que relata el sujeto con adicción), lo que difiere de las conductas y del objetivo (48) que, en este caso, serían la familia, la pareja o los amigos, a quienes no se entrevistó directamente. De esta forma, se estarían incluyendo en la misma subescala dos aspectos conceptuales que no pueden escindirse y que, a pesar de la inestabilidad en la consistencia, se deben mantener.

También se encontró una elevada confiabilidad de los evaluadores en el empleo de la versión adaptada del ISA-6, con un CCI por encima de 0,83 para todas las subescalas. Estos valores fueron superiores a los reportados por Kessler, *et al.* (12), quienes evaluaron separadamente a 41 pacientes y compararon los puntajes obtenidos por dos evaluadores, sin aclarar el tiempo de diferencia entre una y otra entrevista. Los autores encontraron una correlación moderada para las subescalas de "Salud física" (CCI=0,55; $IC_{95\%}$: 0,29 – 0,73) y la "Psiquiátrica" (CCI=0,67; $IC_{95\%}$: 0,45 – 0,81) y alta para las demás subescalas (CCI mayor de 0,7). Es probable que se sobreestime la confiabilidad de las mediciones de dos evaluadores cuando se califica de forma simultánea en una misma entrevista.

La confiabilidad prueba-reprueba indica la estabilidad de los puntajes de la prueba en un intervalo de tiempo en el que no se han presentado cambios en el constructo. En este estudio se encontró una correlación alta entre los puntajes obtenidos en la evaluación inicial y en la repetida en el curso de la semana siguiente por el mismo evaluador, con un CCI superior a 0,72. Para evaluar dicha confiabilidad, en Brasil se utilizó la versión adaptada en el momento del ingreso al tratamiento de la adicción y a 51 de los sujetos se les repitió en el curso de los tres a siete días posteriores a cargo de un calificador diferente. A pesar de la potencial fuente de variación que representaría un entrevistador diferente, los autores encontraron un CCI mayor de 0,73 para todas las subescalas (12). En España se administró la escala en dos ocasiones diferentes separadas por una media de tiempo de 21,8 días (desviación estándar, DE=12,6). Las autores reportaron un valor de ro que osciló entre 0,36 ("Social – Problemas") y 0,96 ("Social – Apoyo") y 1 ("Social Hijos") (13). Es probable que la baja confiabilidad observada en algunas subescalas se deba al amplio intervalo de tiempo, durante el cual podrían haberse dado cambios en el constructo, aspecto reflejado por la escala de forma confiable.

Se confirmaron también las hipótesis sobre la relación del ISA-6 con otros cuestionarios que se aproximan a la dimensión medida por cada subescala. El consumo de tóxicos tiene diversas implicaciones para la salud física, esto por el efecto derivado de la sustancia, la vía de administración, las conductas de riesgo asociadas, y los síntomas físicos de la abstinencia, entre otros (49-51).

En el SF-36 se ha visto que la percepción de salud de los pacientes está relacionada con la evaluación de la gravedad de su adicción por parte del clínico (52), por lo que la puntúan con menores valores en comparación con la población general (53).

En este estudio se encontró una correlación de -0,72 con el PSC de la SF-12, lo que indica que cuanto mayor es el deterioro físico, menor es la calidad de vida. En el proceso de remisión de pacientes con base en los resultados del ISA-6 en Estados Unidos, se evaluó esta misma relación y se encontró una correlación de -0,64 (11). En Brasil esta subescala se comparó con el dominio físico de la escala de calidad de vida de la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization Quality of Life*, WHOQOL-BREF) y se calculó un coeficiente de correlación de Pearson (r) de -0,41 ($p<0,05$) (12).

La salud mental también resulta afectada con las adicciones. Se han encontrado con mayor frecuencia síntomas ansiosos, psicóticos y depresivos que incluyen la conducta suicida, así como alteraciones en la conducta y en los ritmos biológicos, en pacientes con adicción al consumo de alcohol y de drogas (54-57), síntomas estos que se relacionan con una peor calidad de vida (58). En esta validación, la correlación entre la gravedad de la subescala

"Psiquiátrica" fue negativa y alta, con un MSC del SF-12 (r=-0,85) similar a lo encontrado en la remisión basada en el cuestionario (-0,61). Con la versión brasileña se encontró una alta correlación indirecta con el dominio psicológico de la WHOQOL-BREF (r=-0,75). Todo esto indica que el efecto de la adicción en la salud física y mental puede evaluarse de forma válida mediante el ISA-6.

El efecto de la adicción en la situación laboral también es evidente. La incidencia del consumo es mayor entre los individuos que están desempleados, y los individuos con adicción pierden con frecuencia sus trabajos, lo que se ha relacionado con más recaídas y un aumento en el patrón de consumo (59,60).

Con el WHODAS 2.0 se evaluó la discapacidad que experimentaban los pacientes en el trabajo y se encontró una correlación alta con la gravedad de la adicción en la subescala "Empleo". Esta misma subescala se comparó en la remisión, y en la validación en Brasil del ISA-6, con el desempeño laboral medido con la *Social Adjustment Scale Self-Report* (SAS-SR) y se encontró una correlación positiva (r=0,76 y 0,47, respectivamente) (11,12).

Las relaciones sociales también se ven afectadas por el consumo de tóxicos. Las discusiones, las amenazas, el maltrato y la violencia contra la pareja o la familia son frecuentes, así como el aumento en los gastos familiares y la negligencia en los deberes (61-63). Con el WHODAS 2.0 se evaluaron las dificultades en las interacciones con los demás (pareja, familia o amigos) y se encontró una correlación positiva significativa con la subescala "Social – Problemas", en la cual, precisamente, se incluyen este tipo de conflictos.

En los estudios en los que se han contrastado los puntajes del área social de la SAS-SR y el ISA-6 (11,12), los coeficientes de correlación han sido bajos (0,4 y 0,25). Es probable que ello se explique por la diferencia de constructos, pues en la SAS-SR se evalúa el desempeño en las últimas dos semanas en las relaciones sociales, específicamente en el desempeño en las tareas esperadas, las asperezas con los miembros de la familia, los sentimientos y las satisfacciones (64). La subescala "Social – Problemas", en cambio, puntúa los problemas de relación y las discusiones con la pareja, la familia y los amigos, el desenlace violento de las interacciones, el grado de preocupación por estos problemas y la necesidad de una asesoría en este sentido. Es probable que el puntaje de discapacidad social del WHODAS 2.0 ofrezca una visión cercana al de las consecuencias sociales del consumo.

La estimación de la validez de constructo de la subescala "Legal" es compleja dada la ausencia de un instrumento que evalúe directamente la comisión de delitos en el mes anterior. En este estudio se comparó el puntaje de esta dimensión con el número de indicadores del criterio A para el diagnóstico del trastorno de personalidad antisocial, y se obtuvo una correlación significativa. Por el contrario, en Estado Unidos la hipótesis de validez de constructo se probó con el número de arrestos en los dos años anteriores y la correlación fue baja (r=0,15); también se comparó con la escala de socialización del *California Psychological Inventory*, en la que se puntúan las fortalezas del paciente para socializar y aceptar reglas sociales según su propio reporte, y se encontró una correlación negativa baja (r=-0,14) (11). Una posible explicación es que no todos los actos ilegales conducen necesariamente a arrestos; también es posible que las escalas diligenciadas por los propios pacientes no sean indicadores reales de rasgos antisociales, precisamente por el sesgo que implican características nucleares antisociales como la mentira y la manipulación (65).

En Brasil se comparó el comportamiento de esta subescala con el dominio de “Ambiente” de la WHOQOL-BREF, el cual incluye las fuentes financieras y la seguridad, pero era de esperarse una correlación baja (r=0,42), dado que son constructos diferentes (12).

Para las subescalas de “Alcohol” y “Drogas”, la validez de constructo se evalúo comparando con el SIP, y se obtuvo una correlación alta. En el estudio de la interconsulta empleando el ISA-6, se encontró una relación similar (r=0,69 para “Alcohol” y r=0,61 para “Drogas”) (11). En Brasil se encontró una relación (r=0,72 para “Alcohol” y r=0,89 para “Drogas”) con el *Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test* (ASSIST) desarrollado para detectar el abuso y la dependencia de sustancias (12). La validez de constructo en España se midió para todas las subescalas con la escala de *Clinical Global Impression* (CGI) sin ninguna modificación y todas las correlaciones estuvieron por debajo de 0,24 (13), lo cual era previsible, pues es una escala que informa de manera general qué tan enfermo se encuentra el paciente (66).

En cuanto al aspecto divergente, se encontró únicamente una correlación entre la subescala de “Salud física” y la discapacidad en la movilidad del WHODAS 2.0. Es probable que entre los síntomas físicos calificados con el ISA-6, se incluyeran el dolor de origen musculo-esquelético con efecto en la movilidad y la capacidad para ponerse de pie, los cuales serían dos constructos relacionados conceptualmente.

Es posible ver, entonces, que en pacientes en quienes no ha cambiado la gravedad de la adicción, el grado de los puntajes de las diferentes subescalas del ISA-6 son los mismos cuando diferentes evaluadores evalúan diferentes grupos de ítems en un corto periodo. Asimismo, la gravedad de la adicción y sus consecuencias físicas, mentales, laborales, sociales y legales quedan adecuadamente reflejadas en el cuestionario y, por ello, este puede utilizarse en el medio colombiano para evaluar pacientes con adicciones que buscan tratamiento.

Entre las limitaciones de este estudio se debe mencionar la inclusión de una mayoría de individuos con un alto nivel educativo y perteneciente al régimen contributivo del sistema de salud, lo que puede afectar la generalización de los datos, pues algunas de las preguntas del instrumento requerirían habilidades matemáticas y una apreciable capacidad de abstracción.

Por ello es probable que sean necesarios estudios adicionales que incluyan pacientes con otras características. Asimismo, la confiabilidad de los evaluadores pudo haberse sobreestimado, ya que el ISA-6 es una entrevista semiestructurada y pueden darse variaciones en la formulación de las preguntas por parte de cada entrevistador y, por ende, generarse respuestas diferentes que afecten la puntuación. También existe un sesgo inherente a la población de estudio y es la deseabilidad social.

En general, la conducta adictiva lleva inherente una carga social, y es posible que los participantes tiendan a minimizar la información o la gravedad de su situación para evitar ser juzgados o complacer a los terapeutas. Aunque no era parte del objetivo de este estudio, es importante mencionar que se requiere un análisis factorial de la estructura de la escala para confirmar la validez. Dado el propósito evaluativo de la escala, también es necesario evaluar la sensibilidad al cambio, lo cual los autores abocarán en un futuro estudio.

En conclusión, la versión adaptada al contexto colombiano del ISA-6 puede considerarse un cuestionario de evaluación de la gravedad de la adicción de los pacientes que asisten a tratamiento. Se demostró que las subescalas que lo componen tienen una buena confiabilidad y la validez de constructo necesarias para introducir su uso en la práctica clínica e individualizar el tratamiento en función de las necesidades de cada paciente.

## Agradecimientos

Agradecemos a todos los pacientes que participaron en el estudio, y al personal administrativo y clínico de las instituciones participantes.

## Referencias

1. Sussman S, Sussman AN. Considering the definition of addiction. Int J Environ Res Public Health. 2011;8:4025-38. https://doi.org/10.3390/ijerph8104025
2. United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report, 2017. Fecha de consulta: 12 de octubre de 2018. New York: United Nations Office on Drugs and Crime; 2017. p. 68. Disponible en: https://www.unodc.org/wdr2017/field/Booklet_2_HEALTH.pdf
3. Ministerio de Justicia y del Derecho, Ministerio de Salud y Protección Social. Estudio Nacional de Consumo de Sustancias Psicoactivas en Colombia - 2013. Fecha de consulta: 12 de octubre de 2018. Bogotá: ALVI Impresores S.A.S; 2014. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/colombia/2014/Julio/Estudio_de_Consumo_UNODC.pdf
4. Leshner AI. Addition is a brain disease, and it matters. Science. 1997;278:45-7. https://doi.org/10.1126/science.278.5335.45
5. French MT, McGeary KA, Chitwood DD, McCoy CB. Chronic illicit drug use, health services utilization and the cost of medical care. Soc Sci Med. 2000;50:1703-13. https://doi.org/10.1016/S0277-9536(99)00411-6
6. Degenhardt L, Whiteford HA, Ferrari AJ, Baxter AJ, Charlson FJ, Hall WD, *et al.* Global burden of disease attributable to illicit drug use and dependence: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet. 2013;382:1564-74. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61530-5
7. Sartor R. The social impact of drug abuse on community life. Med Law. 1991;10:205-8.
8. Choenni V, Hammink A, van de Mheen D. Association between substance use and the perpetration of family violence in industrialized countries: A systematic review. Trauma Violence Abuse. 2015;18:37-50. https://doi.org/10.1177/1524838015589253
9. United Nations Office on Drugs and Crime. Treatnet–International Network of Drug Dependence Treatment and Rehabilitation Resource Centres. Fecha de consulta: 17 de septiembre de 2015. Disponible en: https://www.unodc.org/treatment/en/drug-treatment-network---home-archive.html
10. United Nations Office on Drugs and Crime. Treatnet. Quality standards for drug dependence treatment and care services. Vienna: United Nations; 2012. Fecha de consulta: 17 de septiembre de 2015. Disponible en: https://www.unodc.org/docs/treatment/treatnet_quality_standards.pdf
11. Cacciola JS, Alterman AI, Habing B, Mclellan AT. Recent status scores for version 6 of the Addiction Severity Index (ASI-6). Addiction. 2011;106:1588-602. https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2011.03482.x
12. Kessler F, Cacciola J, Alterman A, Faller S, Souza-Formigoni ML, Cruz MS, *et al.* Psychometric properties of the sixth version of the Addiction Severity Index (ASI-6) in Brazil. Rev Bras Psiquiatr 2012;34:24-33. https://doi.org/10.1590/S1516-44462012000100006
13. Díaz-Mesa EM, García-Portilla P, Sáiz PA, Bascarán TB, Casares MJ, Fonseca E, *et al.* Rendimiento psicométrico de la sexta versión del Addiction Severity Index en español (ASI-6). Psicothema. 2010;22:513-9.
14. Hospital Mental de Antioquia. Segundo Taller sobre Aplicación de Instrumentos Clínico-Investigativos en la Adicción. Manual de aplicación, calificación e interpretación. Bello: Hospital Mental de Antioquia; 1988. p. 147.
15. Martin CS, Langenbucher JW, Chung T, Sher KJ. Truth or consequences in the diagnosis of substance use disorders. Addiction. 2014;109:1773-8. https://doi.org/10.1111/add.12615

16. McLellan AT. Is addiction an illness—can it be treated? Subst Abus. 2002;23:67-94.

17. Bonett DG. Sample size requirements for testing and estimating coefficient alpha. J Educ Behav Stat. 2002;27:335-40. https://doi.org/10.3102/10769986027004335

18. Walter SD, Eliasziw M, Donner A. Sample size and optimal designs for reliability studies. Stat Med. 1998;17:101-10.

19. Streiner D, Norman G, Cairney J. Health Measurement Scales. A practical guide to their development and use. Fifth Edit. New York: Oxford University Press; 2015.

20. Bonett DG, Wright TA. Sample size requirements for estimating Pearson, Kendall and Spearman correlations. Psychometrika. 2000;65:23-8. https://doi.org/10.1007/BF02294183

21. International Test Commission. International Guidelines on Test Adaptation. Fecha de consulta: 17 de septiembre de 2015. 2005. Disponible en: https://www.intestcom.org/files/guideline_test_adaptation_2ed.pdf

22. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Clasificación Internacional Uniforme de Ocupaciones. CIUO - 08 A.C. Adaptada para Colombia. Fecha de consulta: 17 de septiembre de 2015. Bogotá D.C.: DANE; 2015. p. 443. Disponible en: https://www.dane.gov.co/files/sen/nomenclatura/ciuo/CIUO_08_AC_2015_07_21.pdf

23. Terwee CB, Bot SD, de Boer MR, van der Windt DA, Knol DL, Dekker J, *et al*. Quality criteria were proposed for measurement properties of health status questionnaires. J Clin Epidemiol 2007;60:34-42. https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2006.03.012

24. Alterman AI, McDermott PA, Cook TG, Metzger D, Rutherford MJ, Cacciola JS, *et al*. New scales to assess change in the Addiction Severity Index for the opioid, cocaine, and alcohol dependent. Psychol Addict Behav. 1998;12:233-46. https://doi.org/10.1037/0893-164X.12.4.233

25. Alterman AI, Cacciola JS, Habing B, Lynch KG. Addiction severity index recent and lifetime summary indexes based on nonparametric item response theory methods. Psychol Assess. 2007;19:119-32. https://doi.org/10.1037/1040-3590.19.1.119

26. Cacciola JS, Alterman AI, Habing B, McLellan AT. Recent status scores for version 6 of the Addiction Severity Index (ASI-6). Addiction. 2011;106:1588-602. https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2011.03482.x

27. Grissom GR, Bragg A. Addiction Severity Index: Experience in the field. Int J Addict. 1991;26:55-64.

28. Mokkink LB, Terwee CB, Knol DL, Stratford PW, Alonso J, Patrick DL, *et al*. The COSMIN checklist for evaluating the methodological quality of studies on measurement properties: A clarification of its content. BMC Med Res Methodol. 2010;10:22. https://doi.org/10.1186/1471-2288-10-22

29. Bastiaens L, Galus J, Goodlin M. The 12 Item W.H.O.D.A.S. as primary self report outcome measure in a correctional community treatment center for dually diagnosed patients. Psychiatr Q. 2015;86:219-24. https://doi.org/10.1007/s11126-014-9322-6

30. Thomas McLellan A, Cacciola JC, Alterman AI, Rikoon SH, Carise D. The Addiction Severity Index at 25: Origins, contributions and transitions. Am J Addict. 2006;15:113-24. https://doi.org/10.1080/10550490500528316

31. Iraurgi-Castillo I. Comparación del instrumento de salud SF-12 frente al SF-36 en pacientes en mantenimiento con metadona. Adicciones. 2007;19:59-67.

32. Lugo LH, García HI, Gómez C. Confiabilidad del cuestionario de calidad de vida en salud SF-36 en Colombia. Rev Fac Nac Salud Pública. 2006;24:37-50.

33. Ramírez-Vélez R, Agredo-Zúñiga RA, Jerez-Valderrama AM. Confiabilidad y valores normativos preliminares del cuestionario de salud SF-12 (Short Form 12 Health Survey) en adultos Colombianos. Rev Salud Pública. 2010;12:807-19.

34. World Health Organization. WHO Disability Assessment Schedule 2.0 (WHODAS 2.0) 2016. Fecha de consulta: 27 de abril de 2016. Disponible en: http://www.who.int/classifications/icf/more_whodas/en/

35. Mas-Expósito L, Amador-Campos JA, Gómez-Benito J, Lalucat-Jo L. The World Health Organization Short Disability Assessment Schedule: A validation study in patients with schizophrenia. Compr Psychiatry. 2012;53:208-16. https://doi.org/10.1016/j.comppsych.2011.02.009

36. Buist-Bouwman MA, Ormel J, De Graaf R, Vilagut G, Alonso J, Van Sonderen E, *et al*. Psychometric properties of the World Health Organization Disability Assessment Schedule used in the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders. Int J Methods Psychiatr Res 2008;17:185-97. https://doi.org/10.1002/mpr.261

37. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Fifth Edit. Arlington: American Psychiatric Publishing; 2013.

38. Gold LH. DSM-5 and the assessment of functioning: The World Health Organization Disability Assessment Schedule 2.0 (WHODAS 2.0). J Am Acad Psychiatry Law. 2014;42:173-81.

39. World Health Organization. Measuring health and disability: Manual for WHO disability assessment schedule WHODAS 2.0. Üstün T, Kostanjsek N, Chatterji S, Rehm J, editores. Geneve: World Health Organization; 2010.

40. Kiluk BD, Dreifuss JA, Weiss RD, Morgenstern J, Carroll KM. The Short Inventory of Problems – Revised (SIP-R): Psychometric properties within a large, diverse sample of substance use disorder treatment seekers. Psychol Addict Behav. 2013;27:307-14. https://doi.org/1037/a0028445

41. Alterman AI, Cacciola JS, Ivey MA, Habing B, Lynch KG. Reliability and validity of the alcohol short index of problems and a newly constructed drug short index of problems. J Stud Alcohol Drugs. 2009;70:304-7.

42. Kiluk BD, Dreifuss JA, Weiss RD, Horigian VE, Carroll KM. Psychometric properties of a Spanish-language version of the Short Inventory of Problems. Psychol Addict Behav. 2013;27:893-900. https://doi.org/10.1037/a0032805

43. de Vet HCW, Terwee CB, Mokkink LB, Knol DL. Measurement in Medicine. New York: Cambridge University Press; 2011.

44. López-Pina J. Coeficiente alfa y dimensionalidad en los tests psicométricos. Avances en Medición. 2008;6:131-41.

45. Mukaka MM. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. Malawi Med J. 2012;24:69-71.

46. Martínez-Jiménez YP, Cote-Menéndez M, Prieto-Suárez E. Evaluación y diagnóstico multidimensional según el Índice de Severidad de la Adicción, versión 6.0 (ASI-6) en español, de las personas que ingresan a un centro de atención en adicciones en la ciudad de Bogotá, Colombia (2014-2015). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2015. Fecha de consulta: 11 de octubre de 2018. Disponible en: http://www.bdigital.unal.edu.co/50808/1/1140814805.2015.pdf

47. Gil HL, Mello DF de, Ferriani M das GC, Silva MA. Perceptions of adolescents students on the consumption of drugs: A case study in Lima, Perú. Rev Lat Am Enfermagem. 2008;16:551-7.

48. Manders WA, Janssens JM, Cook WL, Oud JH, De Bruyn EE, Scholte RH. Perceptions of problem behavior in adolescents' families: Perceiver, target, and family effects. J Youth Adolesc. 2009;38:1328-38. https://doi.org/10.1007/s10964-008-9339-y

49. Mertens JR, Lu YW, Parthasarathy S, Moore C, Weisner CM. Medical and psychiatric conditions of alcohol and drug treatment patients in an HMO. Arch Intern Med. 2003;163:2511-17. https://doi.org/10.1001/archinte.163.20.2511

50. Cullen W, O'Brien S, O'Carroll A, O'Kelly FD, Bury G. Chronic illness and multimorbidity among problem drug users: A comparative cross sectional pilot study in primary care. BMC Fam Pract. 2009;10:25-32. https://doi.org/10.1186/1471-2296-10-25

51. Meier MH, Caspi A, Cerdá M, Hancox RJ, Harrington H, Houts R, *et al*. Associations between cannabis use and physical health problems in early midlife. JAMA Psychiatry. 2016;73:731-40. https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2016.0637

52. Richter D, Eikelmann B, Berger K. Use of the SF-36 in the evaluation of a drug detoxification program. Qual Life Res 2004;13:907-14. https://doi.org/10.1023/B:QURE.0000025589.07313.46

53. Neale J. Measuring the health of Scottish drug users. Health Soc Care Community. 2004;12:202-11. https://doi.org/10.1111/j.1365-2524.2004.00489.x

54. Amin-Esmaeili M, Rahimi-Movaghar A, Sharifi V, Hajebi A, Mojtabai R, Radgoodarzi R, *et al*. Alcohol use disorders in Iran: Prevalence, symptoms, correlates, and comorbidity. Drug Alcohol Depend. 2017;176:48-54. https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.02.018

55. Subodh BN, Hazari N, Elwadhi D, Basu D. Prevalence of dual diagnosis among clinic attending patients in a de-addiction centre of a tertiary care hospital. Asian J Psychiatr. 2017;25:169-74. https://doi.org/10.1016/j.ajp.2016.10.020

56. Roncero C, Grau-López L, Palma-Álvarez RF, Rodríguez-Cintas L, Ros-Cucurull E, Esojo A, *et al*. Higher severity of cocaine addiction is associated with tactile and somatic hallucinations. Eur Psychiatry. 2017;42:63-9. https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2016.11.006

57. Østergaard MLD, Nordentoft M, Hjorthøj C. Associations between substance use disorders and suicide or suicide attempts in people with mental illness: A Danish nation-wide, prospective, register-based study of patients diagnosed with schizophrenia, bipolar disorder, unipolar depression or personal. Addiction. 2017;112:1250-9. https://doi.org/10.1111/add.13788

58. Paiva CB, Ferreira IB, Bosa VL, Narváez JC de M. Depression, anxiety, hopelessness and quality of life in users of cocaine/crack in outpatient treatment. Trends Psychiatry Psychother. 2017;39:34-42. https://doi.org/10.1590/2237-6089-2015-0065

59. Henkel D. Unemployment and substance use: A review of the literature (1990-2010). Curr Drug Abuse Rev. 2011;4:4-27. https://doi.org/10.2174/1874473711104010004

60. Janlert U. Unemployment as a disease and diseases of the unemployed. Scand J Work Environ Health. 1997;23 (Suppl. 3):79-83.

61. Velleman R, Bennett G, Miller T, Orford J, Rigby K, Tod A. The families of problem drug users: A study of 50 close relatives. Addiction. 1993;88:1281-9. https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.1993.tb02150.x

62. Amin-Esmaeili M, Hefazi M, Radgoodarzi R, Motevalian A, Sharifi V, Hajebi A, *et al*. Out-of-pocket cost of drug abuse consequences: Results from Iranian National Mental Health Survey. East Mediterr Health J. 2017;23:150-60.

63. Wilson IM, Graham K, Taft A. Living the cycle of drinking and violence: A qualitative study of women's experience of alcohol-related intimate partner violence. Drug Alcohol Rev. 2017;36:115-24. https://doi.org/10.1111/dar.12405

64. Gameroff MJ, Wickramaratne P, Weissman MM. Testing the Short and Screener versions of the Social Adjustment Scale - Self-report (SAS-SR). Int J Methods Psychiatr Res. 2012;21:52-65. https://doi.org/10.1002/mpr.358

65. Ray JV, Hall J, Rivera-Hudson N, Poythress NG, Lilienfeld SO, Morano M. The relation between self-reported psychopathic traits and distorted response styles: A meta-analytic review. Personal Disord. 2013;4:1-14. https://doi.org/10.1037/a0026482

66. Busner J, Targum SD, Miller DS. The Clinical Global Impressions scale: Errors in understanding and use. Compr Psychiatry. 2009;50:257-62. https://doi.org/10.1016/j.comppsych.2008.08.005

Biomédica 2019;39:405-14
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.4378

Comunicación breve

# Primera caracterización molecular de *Leishmania infantum* en pacientes con leishmaniosis visceral de la Provincia de Misiones, Argentina

Ricardo G. Díaz[1], Karina A. Salvatierra[1], Gustavo A Silva[1], Enrique J. Deschutter[1], Fernando J. Bornay-Llinares[2], Lucrecia Acosta[2,3]

[1] Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Posadas, Misiones, Argentina
[2] Área de Parasitología, Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente, Universidad Miguel Hernández de Elche, San Juan, Alicante, España
[3] Unidad de Biología Molecular, Sanatorio Fontilles, Alicante, España

**Introducción.** La leishmaniosis cutánea por *Leishmania braziliensis* ha sido tradicionalmente endémica en Argentina y se han sido descritos casos de compromiso visceral después de una leishmaniosis cutánea inicial. La leishmaniosis visceral emergió en Argentina en el año 2006 en la ciudad de Posadas, provincia de Misiones, afectando tanto a humanos como a perros.
**Objetivo.** Identificar el agente etiológico a nivel de especie de los pacientes diagnosticados con leishmaniosis visceral en Misiones y describir sus características clínico-epidemiológicas.
**Materiales y métodos.** Se estudió una serie de 24 pacientes con diagnóstico confirmado de leishmaniosis visceral en la provincia de Misiones en el período 2009 al 2016. Para la identificación de *Leishmania* spp., los pacientes fueron sometidos a estudios diagnósticos indirectos (serológicos) y directos (microscopía, detección de ADN y secuenciación). También, se estudiaron variables como edad, sexo, lugar de residencia, y signos y síntomas clínicos indicativos de leishmaniosis visceral.
**Resultados.** De los 24 pacientes estudiados, 18 (75 %) eran hombres y 6 (25 %) eran menores de cuatro años. La manifestación clínica más frecuente fue el síndrome febril prolongado en 21 (87,5 %) de los pacientes, seguido de esplenomegalia en 17 (70,8 %). Se identificó la especie *Leishmania infantum* en todos los pacientes estudiados.
**Conclusión.** Este hallazgo constituye la primera identificación de la especie *L. infantum* en pacientes autóctonos de la provincia de Misiones. El estudio evidenció la importancia de la PCR para el manejo epidemiológico de la leishmaniosis visceral en Argentina.

**Palabras clave:** *Leishmania infantum*; reacción en cadena de la polimerasa; leishmaniasis visceral; Argentina.

**First molecular characterization of *Leishmania infantum* species in patients infected with visceral leishmaniasis in Misiones province, Argentina**

**Introduction:** Cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis* has been historically endemic in Argentina and several cases of visceral leishmaniasis following initial cutaneous leishmaniasis have been reported. Visceral leishmaniasis started to appear in Argentina in 2006 in the city of Posadas, Misiones province, affecting both humans and dogs.
**Objective:** To identify the etiologic agent to species level in patients with visceral leishmaniasis diagnosis in Misiones province and describe its clinical and epidemiological characteristics.
**Materials and methods:** A cohort of 24 patients from Misiones province was studied from 2009 to 2016, all with a confirmed diagnosis of visceral leishmaniasis. To identify the *Leishmania* species involved, patient samples were analyzed by microscopy, serologic studies, DNA detection, and sequencing. Variables such as age, sex, place of residence, clinical signs and symptoms consistent with visceral leishmaniasis were also recorded.
**Results:** 75% (18/24) of the patients studied were males and 25% (6/24) were younger than 4 years. The most frequent symptom was a prolonged fever in 87.5% of the patients (21/24), followed by splenomegaly in 70.8% (17/24). *Leishmania infantum* was the only parasite species identified in all patients.
**Conclusion:** This finding constitutes the first molecular identification of the *Leishmania infantum* species in autochthonous patients of Misiones province, Argentina. This study highlights the importance of PCR for species identification in epidemiological studies of visceral leishmaniosis in Argentina.

**Keywords:** *Leishmania infantum*, polymerase chain reaction, leishmaniasis, visceral; Argentina.

**Recibido:** 26/02/18
**Aceptado:** 09/09/18
**Publicado:** 12/09/18

**Citación:**
Díaz RG, Salvatierra KA, Silva GA, Deschutter EJ, Bornay-Llinares FJ, Acosta L. Primera caracterización molecular de *Leishmania infantum* en pacientes con leishmaniosis visceral de la Provincia de Misiones, Argentina. Biomédica. 2019;39:405-14
https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.4378

**Correspondencia:**
Lucrecia Acosta, Área de Parasitología, Universidad Miguel Hernández de Elche, Edificio Muhammad Al-Shafra, Campus de Sant Joan d´Alacant s/n, 03550 Sant Joan, Alicante, España
Teléfono: (0034) 9659 19350
lacosta@umh.es

**Contribución de los autores:**
Enrique J. Deschutter, Fernando J. Bornay-Llinares, Gustavo A Silva: conceptualización y diseño del estudio
Gustavo A Silva: estudios de laboratorio
Karina A. Salvatierra: caracterización molecular de las especies
Ricardo G. Díaz y Lucrecia Acosta participaron en todas las etapas del estudio.
Todos los autores participaron en la redacción y la corrección del manuscrito.

**Financiación:**
Este estudio se llevó a cabo con fondos para los proyectos de investigación incentivados y otorgados por la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones, Resolución CD325-13, en el marco del proyecto "Optimización del diagnóstico de leishmaniasis visceral humana y canina en Misiones", así como por el Sanatorio Fontilles y el programa de cooperación para el desarrollo de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

**Conflicto de intereses:**
Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Las leishmaniosis engloban un conjunto de enfermedades parasitarias de transmisión vectorial que afectan tanto al ser humano como a otros vertebrados. Estas parasitosis son causadas por diferentes especies de protozoos intracelulares del género *Leishmania,* que son transmitidos por picaduras de las hembras hematófagas de la subfamilia *Phlebotominae* (1).

Las leishmaniosis son endémicas en 98 países de cinco continentes y se diagnostican anualmente 1,3 millones de nuevos casos, de los cuales 300.000 son de leishmaniosis visceral. Más de 310 millones de personas viven en zonas de riesgo de contraer leishmaniasis visceral y de 20.000 a 50.000 personas mueren anualmente (2).

Esta leishmaniasis es mundialmente reconocida como una de las enfermedades infecciosas más importantes y afecta principalmente a la población pobre que vive en áreas rurales y suburbanas; es endémica en la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales tanto del Nuevo como del Viejo Mundo (3).

En un estudio realizado en la ciudad de Posadas, se concluyó que la mala calidad de la vivienda y el hacinamiento (pobreza estructural) se asociaban positivamente con el incremento del riesgo de contraer leishmaniasis visceral humana (4). En los focos registrados en la provincia de Misiones es característica la urbanización no planificada que intercala áreas verdes y de uso doméstico, donde la cantidad de material orgánico es abundante, lo cual favorece la colonización y la persistencia del vector *Lutzomyia longipalpis*. Estas características ambientales y socio-geográficas se asocian, por lo general, con deficientes servicios sanitarios y dificultades de acceso al sistema de salud, lo que, a su vez, representa un factor adverso para el diagnóstico temprano de leishmaniasis visceral (5).

En el continente americano, la especie *Leishmania infantum* es el principal agente etiológico de la denominada leishmaniosis visceral zoonótica (1). Se trata de una enfermedad que puede afectar tanto al ser humano como a otros mamíferos –perros domésticos, zorros, lobos, linces, coatíes, ratas, comadrejas y osos hormigueros, entre otros–. Aunque tradicionalmente se ha considerado como una enfermedad rural, hoy en día se encuentra bien establecida en zonas urbanas (1,3,6), en las cuales el perro es el principal reservorio (1,7).

La especie *L. infantum* infecta, principalmente, macrófagos de órganos hematopoyéticos –médula ósea, bazo e hígado–, causando graves disfunciones orgánicas.

En Posadas (Misiones, Argentina), se detectó el primer caso autóctono de leishmaniasis visceral humana en el 2006 (8). Hasta hoy, se han detectado más de 100 casos con una mortalidad del 10 %, tal como se ha descrito en otras regiones del mundo (9,10).

La leishmaniasis visceral en Argentina se encuentra en expansión, así como sus vectores (11-13), y se han detectado casos humanos en otras cuatro provincias: Salta, Entre Ríos, Santa Fe y Santiago del Estero (12,14-17).

El presente estudio tuvo como objetivos describir sus características clínicas y epidemiológicas, e identificar, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la especie o especies del género *Leishmania* involucradas en una serie de pacientes con leishmaniasis visceral confirmados por el sistema nacional de vigilancia en salud de Argentina en el período 2009 a 2016 en la provincia de Misiones. Asimismo, se evaluó la utilidad de esta técnica para el diagnóstico y los estudios epidemiológicos.

## Materiales y métodos

### *Área de estudio*

La provincia de Misiones posee un clima típicamente subtropical: caluroso, con abundantes lluvias y alta humedad relativa. Comprende una superficie de 29.801 km$^2$ y limita al norte y al este con Brasil, y al oeste con Paraguay. Según el censo del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC), en el 2010 Misiones contaba con 1'101.593 habitantes, de los cuales el 49,68 % eran hombres (18).

### *Pacientes*

Se seleccionaron los pacientes de la provincia de Misiones que concurrieron a consulta clínica al Hospital Escuela de Agudos "Ramón Madariaga" entre el 2009 y 2016, resultaron ser casos confirmados de leishmaniasis visceral y en quienes se logró amplificar mediante PCR el ADN correspondiente al género *Leishmania*.

Finalmente, fueron objeto de estudio 24 pacientes. Estos cumplieron los siguientes criterios de inclusión:

i. residir en la provincia de Misiones, concurrir a consulta clínica y resultar caso sospechoso de leishmaniasis visceral;

ii. dar el consentimiento para usar el material clínico en los estudios de caracterización del agente etiológico, y

iii. tener, al menos, un resultado positivo en alguna de las siguientes técnicas: inmunocromatografía, examen directo por microscopía o estudios moleculares (PCR).

No se incluyó el total de pacientes del período de estudio por no cumplir todos ellos con los criterios de inclusión.

### *Toma de muestra y recolección de datos*

Las fichas clínico-epidemiológicas en las que el profesional médico asentó los datos pertinentes del paciente, incluían la siguiente información: fecha de toma de la muestra, edad, sexo y localidad de residencia. El laboratorio no recibe datos que identifiquen al paciente.

Los síntomas y signos clínicos registrados en el estudio fueron la presencia o ausencia de fiebre prolongada, pérdida de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, palidez, ictericia, edema y ganglios linfáticos.

Para los estudios de laboratorio se tomaron dos tipos de muestras: una de médula ósea tomada mediante punción-aspiración de aproximadamente 1,5 ml con 50 µl de EDTA (0,342 M), y 3 ml de sangre periférica mediante punción venosa practicada por el personal del laboratorio de la institución a la cual acudió el paciente. Los tubos con sangre se centrifugaron por 5 minutos a 3.000 rpm para recuperar el suero.

### *Técnicas diagnósticas*

*Técnicas diagnósticas indirectas (serológicas)*

Test inmunocromatográfico rápido basado en el antígeno recombinante rK39 (ICT-rK39). Se analizó el suero de los pacientes seleccionados con tiras

reactivas Kalazar Detect Rapid Test™ (InBIOS International Inc., Seattle, WA) para humanos. La prueba inmunocromatográfica se practicó siguiendo las instrucciones del fabricante.

*Técnicas diagnósticas directas*

Microscopía óptica. Los extendidos de médula ósea tomada mediante punción-aspiración se tiñeron con Giemsa y se examinaron al microscopio óptico en busca de amastigotes de *Leishmania* spp.

*Técnicas moleculares*

i. Extracción de ácidos nucleicos. Todas las muestras de médula ósea se procesaron mediante la columna NucleoSpin Tissue de Macherey-Nagel™ (Bethlehem, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control negativo de extracción, se usó una muestra negativa de médula ósea suministrada por el Hospital Escuela de Agudos “Dr. Ramón Madariaga”.

ii. Detección de ácidos nucleicos. Se amplificó la región del espaciador interno de la transcripción 1 (ITS-1) mediante PCR anidada. El protocolo utilizado para la primera reacción se basó en el que desarrollaron Schönian, *et al*. (19), incluyendo las modificaciones de Cruz, *et al*., para la segunda reacción (20). Con el fin de determinar el buen funcionamiento de los reactivos y su manipulación, se usaron un control negativo (agua bidestilada estéril) y un control positivo (ADN obtenido del aislamiento de cultivo suministrado por el Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chabén”), en cada una de las reacciones de PCR. La visualización de los productos se realizó en un gel de agarosa al 1,5 % teñido con bromuro de etidio.

iii. Caracterización. Este procedimiento se realizó mediante la secuenciación directa de los productos de PCR con los cebadores específicos de la segunda reacción (20), y usando el estuche comercial para secuenciación de ciclos de terminación Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit™, versión 3.1, y el secuenciador de ADN automático ABI Prism 377™ (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias obtenidas se analizaron y se editaron con el programa analizador de secuencias Lasergene™ (DNASTAR, Madison, WI). Posteriormente, las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos GenBank para verificar la coincidencia con alguna especie descrita.

### *Aspectos éticos*

Todos los procedimientos que se llevaron a cabo fueron revisados y aprobados por el Comité de Bioética del Hospital Público Provincial de Pediatría “Dr. Fernando Barreyro” de la ciudad de Posadas. Los protocolos de la toma de muestra y de su manejo se realizaron según las directrices del Hospital Escuela de Agudos “Dr. Ramón Madariaga”.

Todos los participantes del estudio dieron su consentimiento por escrito, según el modelo de consentimiento informado utilizado por este hospital para los estudios de leishmaniasis visceral. Dicho consentimiento avaló la realización de técnicas diagnósticas para la identificación de la especie de *Leishmania*.

## Resultados

Se estudiaron 24 pacientes con diagnóstico de leishmaniasis visceral confirmado mediante observación microscópica directa, test inmunocromatográfico rápido o PCR.

Los pacientes residían mayoritariamente en Posadas (8/24; 33 %). Las demás localidades de residencia fueron: Oberá, con 6 (25 %); San Ignacio, con 5 (20 %); Candelaria, con 3 (12,5 %); Apóstoles, con 1 (4 %), y Alem, con 1 (4 %).

De los 24 pacientes estudiados, 18 (75 %) eran hombres y 6 (25 %) eran menores de cuatro años. En el cuadro 1 se presentan los resultados de laboratorio y la distribución por sexo y edad de los pacientes.

El paciente asintomático fue un neonato, a cuya madre se le diagnosticó leishmaniasis visceral durante el embarazo. Ningún paciente presentó todos los síntomas, aunque dos de ellos presentaron seis síntomas simultáneos.

**Cuadro 1.** Resultados de laboratorio y características epidemiológicas de los pacientes relacionadas con las variables de edad y sexo

| ICT | Frotis | PCR | Edad (años) | Sexo |
|---|---|---|---|---|
| Positivo | Negativo | Positivo | 71 | M |
| Positivo | Positivo | Positivo | 41 | M |
| Positivo | Positivo | Sin dato | 2 | M |
| Positivo | Positivo | Positivo | 46 | M |
| Positivo | Negativo | Sin dato | 75 | F |
| Positivo | Negativo | Sin dato | 44 | M |
| Positivo | Negativo | Positivo | 58 | M |
| Positivo | Positivo | Positivo | 1 | M |
| Positivo | Positivo | Positivo | 3 | F |
| Positivo | Positivo | Positivo | 20 | F |
| Positivo | Positivo | Positivo | 42 | M |
| Positivo | Positivo | Sin dato | 13 | F |
| Negativo | Negativo | Positivo | 78 | M |
| Positivo | Positivo | Positivo | 2 | M |
| Positivo | Negativo | Positivo | 37 | M |
| Positivo | Negativo | Positivo | 39 | M |
| Positivo | Positivo | Sin dato | 0 | M |
| Positivo | Positivo | Positivo | 1 | F |
| Positivo | Positivo | Positivo | 53 | M |
| Positivo | Positivo | Positivo | 11 | M |
| Positivo | Positivo | Positivo | 34 | M |
| Positivo | Positivo | Positivo | 36 | M |
| Negativo | Positivo | Positivo | 24 | F |
| Positivo | Negativo | Positivo | 3 | M |

ICT: test inmunocromatográfico rápido; PCR: reacción en cadena de la polimerasa indicativa de *Leishmania infantum*; M: masculino; F: femenino

En el cuadro 2 se presentan los signos y síntomas clínicos. La manifestación clínica más frecuente resultó ser el síndrome febril prolongado en 21 (87,5 %) pacientes, seguido de esplenomegalia en 17 (70,8 %). Ningún paciente de esta serie presentó ascitis.

De los 24 pacientes estudiados, 19 (79,2 %) resultaron positivos por PCR anidada para el género *Leishmania* y 16 (66,6 %), mediante el frotis. El test inmunocromatográfico rápido resultó positivo en 22 (91,6 %) de los casos.

**Cuadro 2.** Manifestaciones clínicas de los pacientes (n=24)

| Síntomas | n | (%) |
|---|---|---|
| Síndrome febril prolongado | 21 | (87,5) |
| Pérdida de peso | 10 | (41,7) |
| Hepatomegalia | 14 | (58,3) |
| Esplenomegalia | 17 | (70,8) |
| Palidez | 8 | (33,3) |
| Ictericia | 2 | (8,3) |
| Edema | 1 | (4,16) |
| Ganglios linfáticos | 2 | (8,3) |
| Ascitis | 0 | (0,0) |

Fuente: Ministerio de Salud Pública, Provincia de Misiones

Todas las muestras que resultaron positivas por PCR anidada y confirmadas como *Leishmania* spp., se sometieron a secuenciación. En total, 19 muestras de leishmaniasis visceral fueron sometidas a secuenciación y todas las secuencias obtenidas presentaron una identidad del 100 % con la especie *L. infantum.*

## Discusión

El presente estudio constituye el primer trabajo de caracterización molecular de *L. infantum* de los casos de leishmaniasis visceral acontecidos en los últimos años en la provincia de Misiones.

Hasta el año 2006, en que se reportó el primer caso de leishmaniasis visceral autóctono de la Argentina, se habían descrito 17 casos de leishmaniasis visceral dentro del área endémica de leishmaniasis cutánea por *L. braziliensis* y, finalmente, se consideró que todos los casos autóctonos de la forma visceral se habían iniciado como una leishmaniasis cutánea producida por *L. braziliensis* (21). Los casos se describieron como autóctonos de las provincias del norte argentino (ninguno de ellos en Misiones) y cuatro de los casos se consideraron como importados de otros países. Solo un caso fue causado por *L. infantum* en la provincia de Mendoza y fue de origen desconocido (22).

Este hallazgo supone un cambio del cuadro epidemiológico de la leishmaniosis en Argentina. A pesar de que la provincia de Misiones es endémica para la leishmaniasis cutánea desde 1998 (23), y la especie *L. braziliensis* puede ser ocasionalmente viscerotrópica en el país, la única especie encontrada en estos pacientes con leishmaniasis visceral en Misiones fue *L. infantum*.

Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de la caracterización molecular del agente causal de la leishmaniasis visceral para un correcto manejo de los pacientes y un adecuado conocimiento de la epidemiología de la leishmaniosis en el país.

En Argentina la técnica de referencia para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral es la demostración de los parásitos en el material de la punción esplénica o de médula ósea, la que brinda un diagnóstico de certeza (1,24). Sin embargo, debido a la baja sensibilidad de la observación microscópica, el Ministerio de Salud de la Nación (Argentina) recomienda el uso de técnicas complementarias para su diagnóstico (24). En el presente estudio, el 66,6 % de los casos fue positivo a partir del extendido de muestras de médula ósea obtenida mediante punción aspiración, tal como se esperaba de acuerdo con lo observado por otros autores (25-27).

En este sentido, se recomienda el test inmunocromatográfico rápido basado en el antígeno recombinante rK39 (ICT-rK39) como herramienta diagnóstica para la leishmaniasis visceral, considerando sus elevadas sensibilidad y especificidad. Si bien la detección de anticuerpos no implica la presencia de infección activa (24,25), esta es considerada –junto con el cuadro clínico– la prueba de referencia para confirmar los casos humanos de leishmaniasis visceral en Argentina. El test inmunocromatográfico rápido ICT-rK39 resultó positivo en el 91,6 % de los pacientes estudiados, lo cual coincide con lo señalado por diversos autores (del 80 a 90 %) (25).

Actualmente, los estudios moleculares han demostrado ser útiles para su diagnóstico y su caracterización rápida, temprana, y de alta sensibilidad y especificidad. Esta técnica es recomendada también por el Ministerio de Salud de la Nación para el diagnóstico de leishmaniosis visceral (19,20,24,26,28). En el cual la técnica de PCR anidada podría ser una herramienta eficaz para caracterizar la especie causante. Por lo tanto, en el diagnóstico rutinario, la inclusión de la amplificación de los ácidos nucleicos seguida de la caracterización, podrían ser de utilidad para detectar esta infección en la provincia.

En el presente estudio los resultados obtenidos de la PCR anidada se asemejan a los obtenidos por otros autores (85-95 %), y se observó un número similar de posibles falsos negativos debidos a razones no esclarecidas, entre las que estarían la toma o la conservación de la muestra (28-31). La región diana empleada en este estudio (ITS-1) es lo suficientemente conservada para hacer el diagnóstico molecular y, además, presenta suficiente polimorfismo para permitir la tipificación a nivel de especie (19,20,28-30).

El patrón epidemiológico en relación con los parámetros estudiados es diferente a lo observado en otras áreas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de Situación de Salud argentina, el 90 % de los casos de leishmaniasis visceral ocurre en niños menores de 10 años (1,24). Sin embargo, en este estudio no se encontró un patrón definido en cuanto a la edad de los pacientes, si bien es cierto que el 25 % de ellos era menor de cuatro años.

Por otro lado, en los pacientes de Misiones se encontró un mayor porcentaje de hombres infectados, como se ha observado recientemente en otros estudios en Brasil (32,33). La OMS puntualiza que en el pasado las leishmaniosis en las Américas habían sido históricamente enfermedades ocupacionales. Aunque los factores de riesgo ocupacionales siguen teniendo importancia, la presencia del vector en el ambiente peridoméstico ha llevado a un aumento rápido del número de casos de exposición ocupacional (1).

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que en esta área geográfica los factores ocupacionales podrían jugar un papel importante en la transmisión de la enfermedad, lo que se manifiesta con el predominio de casos en hombres adultos.

El movimiento migratorio en puntos como Posadas o Puerto Iguazú podría haber favorecido la aparición de la leishmaniasis visceral en la provincia, ya que en los países vecinos, Paraguay y Brasil, esta enfermedad se encuentra bien establecida; además, la presencia del vector aumenta la posibilidad de transmisión de esta enfermedad entre canes y humanos (34,35).

Las manifestaciones clínicas más frecuentes en los pacientes con leishmaniasis visceral fueron el síndrome febril prolongado y la esplenomegalia; esto concuerda con lo señalado por la OMS (1) y con los registros del sistema de vigilancia de los reportes oficiales del Ministerio de Salud de Misiones para los 116 pacientes notificados (1).

El único paciente asintomático fue un neonato incluido en el estudio, a cuya madre se le diagnosticó leishmaniasis visceral durante el embarazo. Existen evidencias de transmisión vertical de la leishmaniasis visceral, aunque resulta un hecho poco frecuente (36). El neonato de este estudio resultó positivo en las pruebas serológicas y en el frotis de la muestra de la médula ósea, aunque los resultados de las pruebas moleculares fueron negativos (36). Los resultados serológicos positivos en estos neonatos podrían resultar del paso transplacentario de anticuerpos maternos (1,36,37). A pesar de no presentar síntomas, el paciente fue tratado con anfotericina B liposómica y fue dado de alta al completar el tratamiento.

En conclusión, en este estudio se presenta la primera identificación del agente etiológico de la leishmaniasis visceral en Misiones, Argentina, la cual confirmó la presencia de *L. infantum* en estos pacientes. Este hecho amplía el perfil de la epidemiología de la leishmaniosis tradicionalmente establecida en esta provincia. Los resultados muestran la conveniencia de usar la PCR como método de diagnóstico, debido a su alta sensibilidad y especificidad, así como a la posibilidad de tipificar la especie.

La detección temprana de la infección y de los casos asintomáticos mediante PCR podría ayudar a reducir la morbimortalidad de esta infección en el país.

**Agradecimientos**

Al personal médico que realizó el diagnóstico clínico, Gustavo Méndez, Sandra Borchichi y Liliana Arce; al Ministerio de Salud Pública de Misiones, por su ayuda para recabar los datos clínicos, y al Laboratorio de Alta Complejidad Misiones, por su aporte en este estudio.

## Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Control of the leishmaniasis. Fecha de consulta: 19 de marzo de 2018. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf
2. Organización Mundial de la Salud. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO report on neglected tropical diseases, 2015, WHO/HTM/NTD/2015.1. Fecha de consulta: 19 de marzo 2018. Disponible en: http:apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861_eng.pdf?ua=1
3. Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. Parasit Vectors. 2009;26:S1. https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S1
4. López K, Tartaglino LC, Steinhorst II, Santini MS, Salomón OD. Factores de riesgo, representaciones y prácticas asociadas con la leishmaniasis visceral humana en un foco urbano emergente en Posadas, Argentina. Biomédica. 2016;36:51-63. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2953
5. Salomón OD, Mastrángelo AV, Santini MS, Liotta DJ, Yadón ZE. La eco-epidemiología retrospectiva como herramienta aplicada a la vigilancia de la leishmaniasis en Misiones, Argentina, 1920-2014. Rev Panam Salud Pública. 2016;40:29-39.
6. Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. Trends Parasitol. 2006;22:552-7. https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004
7. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. Adv Parasitol. 2004;57:1-88. https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X

8. Salomón OD, Sinagra A, Nevot MC, Barberian G, Paulin P, Estévez JO, *et al.* First visceral leishmaniasis focus in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103:109-11. https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100018

9. Gutiérrez JA, Fleitas C, Milano M, González B. Informe epidemiológico semanal. Posadas: Ministerio de Salud Pública de Misiones; 2016.

10. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7:e35671. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671

11. Quintana MG, Fernández MS, Salomón OD. Distribution and abundance of Phlebotominae, vectors of leishmaniasis, in Argentina: spatial and temporal analysis at different scales. J Trop Med. 2012;2012:652803. https://doi.org/10.1155/2012/652803

12. Fernández MS, Santini MS, Cavia R, Sandoval AE, Pérez AA, Acardi S, *et al.* Spatial and temporal changes in *Lutzomyia longipalpis* abundance, a Leishmania infantum vector in an urban area in northeastern Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108: 817-24. https://doi.org/10.1590/0074-0276130047

13. Szelag EA, Parras MA, Fabiani M, Rosa JR, Salomón OD. Incipient colonisation of *Lutzomyia longipalpis* in the city of Resistencia, province of Chaco, Argentina (2010-2012). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109:488-91. https://doi.org/10.1590/0074-0276130054

14. Acosta L, Díaz R, Torres P, Silva G, Ramos M, Fattore G, *et al.* Identification of *Leishmania infantum* in Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015;57:175-6. https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000200013

15. Barroso PA, Nevot MC, Hoyos CL, Locatelli FM, Lauthier JJ, Ruybal P, *et al.* Genetic and clinical characterization of canine leishmaniasis caused by Leishmania (*Leishmania) infantum* in northeastern Argentina. Acta Tropica. 2015;150:218-23. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.007

16. Barroso PA, Marco JD, Locatelli FM, Cardozo RM, Mora MC, Hoyos CL, *et al.* Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Salta, Argentina: Possible reservoirs and vectors. Am J Trop Med Hyg. 2015;93:334-9. https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0267

17. Gould IT, Perner MS, Santinin MS, Saavedra SB, Bezzi G, Maglianese MI, *et al.* Leishmaniasis visceral en la Argentina. Notificación y situación vectorial (2006-2012). Medicina (B. Aires). 2013;73:104-10.

18. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Censo nacional del año 2010. Fecha de consulta: 14 de diciembre 2016. Disponible en: http://www.indec.gov.ar/nivel4_default.asp?id_tema_1=2&id_tema_2=41&id_tema_3=135

19. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, *et al.* PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003;47:349-58. https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00093-2

20. Cruz I, Millet A, Carrillo E, Chenik M, Salotra P, Verma S, *et al.* An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. Exp Parasitol. 2013;134:281-9. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.026

21. Salomón OD, Sosa SE, Rossi GC, Spinelli G. Presencia de *Lutzomyia longipalpis* y situación de la leishmaniasis visceral en Argentina. Medicina (B. Aires). 2001;61:174-8.

22. Martín-Sánchez J, Navarro-Mari JM, Pasquau-Liaño J, Salomón OD, Morillas-Márquez F. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in a Spanish patient in Argentina: What is the origin of the infection? Case Report. BMC Infect Dis. 2004;4:20. https://doi.org/10.1186/1471-2334-4-20

23. Salomón OD, Sosa SE, Canini L, Córdoba EL. Leishmaniosis tegumentaria en un área con niveles epidémicos de transmisión, Salta, Argentina, 1998. Medicina (B. Aires). 2001;61:284-90.

24. Ministerio de Salud de la Nación. Leishmaniasis visceral. Fecha de consulta: 14 de diciembre 2016. Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000798cnt-2012-03-15_leishmaniasis-visceral-guia.pdf

25. Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, *et al.* Visceral leishmaniasis: Current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. Lancet Infect Dis. 2002;2:494-501. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00347-X

26. Cortes S, Chicharro C, Cruz I, Cristovao JM, Canavate C, Campino L. Genetic diversity of human zoonotic leishmaniasis in Iberian Peninsula. Zoo Pub Heal. 2010;58:234-7. https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2010.01374.x

27. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. Vet Parasitol. 2009;165:1-18. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022

28. Fraga LT, Brustoloni YM, Lima RB, Cavalheiros MB, Oshiro ET, Oliveira J, *et al.* Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105:310-3. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0145-2013

29. Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni C, *et al.* Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV uninfected patients: A single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. Clin Infect Dis. 2007;44:1602-10. https://doi.org/10.1086/518167

30. Cortés S, Rolao N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 2004;98:12-7. https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)00002-6

31. Roelfsema JH, Nozari N, Herremans T, Kortbeek LM, Pinelli E. Evaluation and improvement of two PCR targets in molecular typing of clinical samples of Leishmania patients. Exp Parasitol. 2010;10:1006. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.024

32. Bruhn FR, Morais HF, Bruhn NC, Cardoso DL. Human visceral leishmaniasis: Factors associated with deaths in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil from 2006 to 2013. Epidemiol Infect. 2018;146:565-70. https://doi.org/10.1017/S0950268818000109

33. Lima ID, Lima AL, Mendes-Aguiar CO, Coutinho JF, Wilson ME, Pearson RD, *et al.* Changing demographics of visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Lessons for the future. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12:e0006164. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006164

34. Peres D, Lamounier D, López I, Nery C, Martins P. Short report: Heterogeneity of *Leishmania infantum chagasi* kinetoplast DNA in Teresita (Brazil). Am Soc Trop Med Hyg. 2010;82:819-21. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0600

35. Gómez AE. Análisis de la diversidad genética de *Leishmania infantum* en Paraguay mediante la técnica del kDNA-PCR-RFLP (tesis). Asunción: Universidad Nacional de Asunción; 2013.

36. Figueiró-Filho EA, Duarte G, El-Beitune P, Quintana SM, Lemos Maia T. Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. Infect Dis Obstet Gynecol. 2004;12:31-40. https://doi.org/10.1080/1064744042000210384

37. Mescouto-Borges MM, Maués E, Costa DL, da Silva Pranchevicius MC, Sierra Romero GA. Congenitally transmitted visceral leishmaniasis: Report of two Brazilian human cases. Braz J Infect Dis. 2013;17:263-6. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.017

Biomédica 2019;39:415-26
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.4428

Nota técnica

# Evaluación de un método de amplificación isotérmica mediado por bucle para la detección rápida del virus sincicial respiratorio en niños con infección respiratoria aguda

Alfonso Bettin-Martínez[1,2], José Villareal-Camacho[3], Guillermo Cervantes-Acosta[1], Jorge Acosta-Reyes[4], Juliana Barbosa[5], Homero San Juan[1]

[1] Departamento de Medicina, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia
[2] Posgrado de Microbiología, Universidad Metropolitana, Barranquilla, Colombia
[3] Programa de Medicina, Universidad Libre, Barranquilla, Colombia
[4] Departamento de Salud Pública, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia
[5] Grupo de Virología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** El virus sincicial respiratorio humano (hRSV) es la causa más frecuente de infección respiratoria aguda de las vías respiratorias inferiores en niños menores de cinco años. El desarrollo de técnicas moleculares para identificarlo es uno de los retos actuales en el campo de la investigación clínica.
**Objetivo.** Evaluar un método de amplificación isotérmica para la detección rápida del hRSV en niños con infección respiratoria aguda.
**Materiales y métodos.** Se extrajo el ARN viral de 304 muestras de hisopado nasal en niños con síntomas de infección respiratoria aguda atendidos en el servicio de urgencias del Hospital de la Universidad del Norte en Barranquilla entre abril del 2016 y julio del 2017. Se evaluó la prueba de amplificación isotérmica mediada por bucle mediante transcriptasa inversa de la proteína de la matriz (M) (*Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification*, RT-LAMP) comparada con técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa mediante transcriptasa inversa múltiple anidada (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction,* RT-PCR), la cual se empleó como la prueba estándar, la PCR en tiempo real (*quantitative PCR*, qPCR) y la RT-LAMP de la proteína L (L) para la detección rápida del virus sincicial respiratorio (VSR), subtipo A y subtipo B.
**Resultados.** La prueba de RT-LAMP (M) tuvo una sensibilidad de 93,59 %, una especificidad de 92,92 % y una concordancia de 0,83 ± 0,036 comparada con la prueba de RT-PCR anidada. El índice kappa del RT-LAMP (M) fue superior, y los valores del RT-LAMP (L) y la qPCR concordaron (0,75 ± 0,043 y 0,71 ± 0,045, respectivamente).
**Conclusiones.** Estos resultados indican que la prueba RT-LAMP (M) puede considerarse como una herramienta de utilidad clínica para detectar el hSRVA, dado que el tiempo requerido para la obtención de resultados, así como los costos, es menor, y su desempeño es mejor que el de las otras pruebas moleculares evaluadas.

**Palabras clave:** infecciones del sistema respiratorio; virus sincitiales respiratorios; niños.

**Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of human respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection**

**Introduction:** Human respiratory syncytial virus (hRSV) is the most frequent cause of acute respiratory infection of the lower respiratory tract in children under the age of five. The development of molecular techniques able to identify hRSV is one of the current challenges in the field of clinical research.
**Objective:** To evaluate the ability of an isothermal amplification method to rapidly detect hRSV in children with acute respiratory infection.
**Materials and methods:** We collected 304 nasopharyngeal swab samples from children with symptoms of acute respiratory infection who attended the emergency unit at *Hospital de la Universidad del Norte* in Barranquilla from April, 2016, to July, 2017. After extracting viral RNA from the samples, we evaluated the ability of the reverse transcriptase-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) M assay to rapidly detect hRSVA and hRSVB compared to other molecular techniques: quantitative PCR (qPCR), reverse transcriptase-LAMP L assay, and as a standard, the multiplex nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (nested RT-PCR).
**Results:** The RT-LAMP M assay had a sensitivity of 93.59% and a specificity of 92.92%, and a concordance of 0.83 ± 0.036 as compared with the nested RT-PCR test. While the Kappa index of the RT-LAMP M assay was higher than the values for the RT-LAMP L assay and the qPCR, the values of the latter two methods were in agreement (0.75 ± 0.043 and 0.71 ± 0.045, respectively).

**Recibido:** 19/04/18
**Aceptado:** 09/04/18
**Publicado:** 09/05/18

**Citación:**
Bettin-Martínez A, Villareal-Camacho J, Cervantes-Acosta G, Acosta-Reyes J, Barbosa J, San Juan H. Evaluación de un método de amplificación isotérmica medida por bucle para la detección rápida del virus sincicial respiratorio en niños con infección respiratoria aguda. Biomédica. 2019;2:415-26. https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.4428

**Correspondencia:**
Homero San Juan, Departamento de Medicina, Universidad del Norte, Km 5, antigua vía a Puerto Colombia, Barranquilla, Colombia
Teléfono: 313 543 6508
hsanjuan@uninorte.edu.co

**Contribución de los autores:**
Alfonso Bettin-Martínez: desarrollo de protocolos, procesamiento y diseño de estudio
José Villareal-Camacho: toma de muestras, desarrollo de protocolos, evaluación de la calidad metodológica
Guillermo Cervantes-Acosta: diseño metodológico de los experimentos
Jorge Acosta-Reyes: evaluación de la calidad metodológica, análisis y procesamiento de los datos estadísticos
Juliana Barbosa: desarrollo de los protocolos de laboratorio
Homero San Juan: diseño del estudio e interpretación de los datos
Todos los autores participaron en la redacción del manuscrito.

**Financiación:**
Programa de CT+I en "Enfermedades Infecciosas todo el Departamento, Atlántico, Caribe". Convenio N° 0103-2015-000039. Actividad MGA [955864]. Sistema General de Regalías (SGR). Gobernación del Atlántico

**Conflicto de intereses:**
Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

**Conclusion:** Due to the shorter running times, lower costs and better performance of the RT-LAMP M assay, it can be considered as a useful clinical tool for the detection of RSVA.

**Keywords:** Respiratory tract infections; respiratory syncytial viruses; child.

El virus sincicial respiratorio humano (hRSV) es la causa principal de las afecciones respiratorias de origen viral y de las hospitalizaciones pediátricas a nivel mundial, con 33 millones de casos nuevos cada año. Aunque afecta a todos los grupos etarios, los lactantes (<18 meses de edad) y los ancianos son los grupos que sufren las formas más graves de la infección, que afectan las vías respiratorias inferiores (bronquiolitis y neumonía) (1).

Dadas las consecuencias de la infección, la detección temprana es de crucial importancia para mejorar la evolución del paciente y prevenir la diseminación de la enfermedad. La detección rápida de los virus respiratorios disminuiría sustancialmente los costos asociados con el cuidado del paciente, así como las tasas de hospitalización e, incluso, el uso inadecuado de antibióticos previniendo, así, la aparición de la resistencia frente a ellos (2). Por lo tanto, el desarrollo de pruebas de diagnóstico rápido mediante nuevas técnicas moleculares que permitan identificar el hRSV y otros virus respiratorios circulantes, es uno de los retos actuales en el campo de la investigación clínica.

Recientemente, se ha extendido la implementación de técnicas moleculares con amplificación isotérmica de los ácidos nucleicos y se han desarrollado nuevas variantes para la identificación del hRSV a partir de muestras clínicas, que han demostrado ser más rápidas y sensibles (3,4).

Una técnica que ha llamado la atención en los últimos años es la amplificación isotérmica mediada por bucle (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*, LAMP), desarrollada por Notomi, *et al*. (5). La técnica LAMP usa cuatro a seis cebadores para amplificar la secuencia diana por desplazamiento de la cadena con la ayuda de la enzima ADN polimerasa *Bst*, la cual actúa con una temperatura constante de 60 a 65 °C. Se ha demostrado que el uso de seis cebadores aumenta la velocidad de la amplificación y la especificidad de la prueba LAMP. Una ventaja adicional es que exhibe una mayor estabilidad frente a los inhibidores presentes en las muestras biológicas, que normalmente afectarían el desempeño de una PCR convencional, lo cual contribuye a ahorrar tiempo y a reducir costos en el procesamiento de las muestras (6).

En varios estudios se ha reportado la detección de diversos agentes patógenos mediante el método de amplificación isotérmica (7,8). Además, combinada con enzimas que poseen activad de transcripción inversa, esta técnica puede detectar agentes patógenos cuyo genoma es el ARN, caso en que se la denomina LAMP mediante transcripción inversa. Esto la convierte en la prueba ideal para la detección del hRSV, el cual posee un genoma de ARN de cadena sencilla, no segmentado, y de orientación negativa (9).

En este estudio se describe el desempeño diagnóstico de un ensayo de RT-LAMP para la detección rápida del hRSV del subtipo A (hRSVA) en muestras tomadas por hisopado nasal en niños menores de cinco años atendidos en el servicio de urgencias del Hospital de la Universidad del Norte.

Para el ensayo de RT-LAMP se diseñaron seis cebadores específicos contra los genes que codifican la proteína de la matriz (M) y la nucleocápside del hRSV de los subtipos A y B, respectivamente. El ensayo se validó con una RT-LAMP (L) para el hRSV previamente reportada (10). Los resultados de ambas pruebas se compararon con una RT-PCR múltiplex anidada

(prueba de referencia) y una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) disponible comercialmente.

Se calculó y se discutió el desempeño de la RT-LAMP (M) para el diagnóstico clínico de hRSV en términos de tiempo de detección, sensibilidad, especificidad y razón de verosimilitud.

## Materiales y métodos

### *Diseño y población*

Se hizo un estudio transversal entre abril de 2016 y julio de 2017 en el Hospital de la Universidad del Norte en Barranquilla, Colombia, en niños menores de cinco años atendidos en el servicio de urgencias por infección respiratoria aguda. Se excluyeron los niños con diabetes, enfermedades autoinmunitarias, cáncer y HIV, así como aquellos con alto riesgo de sufrir efectos adversos durante la toma de la muestra (epiglotitis o cualquier alteración en las vías respiratorias altas).

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad del Norte, Colombia. Los padres de los niños dieron su consentimiento informado. El estudio se ajustó a las buenas prácticas clínicas y de laboratorio según los estándares internacionales.

### *Muestras clínicas*

Se evaluaron 304 pacientes sintomáticos. Siguiendo las indicaciones médicas, se tomaron las muestras con hisopado nasal (FLOQSwabs™, Copan Diagnostics Inc.) y fueron suspendidas en medio de transporte universal con antibióticos (UTM™, Viral Transport Media, USA) para su envío al laboratorio de virología.

Posteriormente, el sobrenadante se dividió en tres alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta su procesamiento. Una alícuota se usó para extraer el ARN viral con el estuche QIAamp Viral RNA Mini (Qiagen, Venlo, Netherlands). Una alícuota de 140 µL se procesó según las instrucciones del fabricante hasta obtener 60 µL de ARN viral eluido. La concentración y la pureza del ARN se determinaron en un espectrofotómetro NanoDrop 2000™ (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

### *Diseño del ensayo de RT-LAMP*

Para el ensayo de RT-LAMP se diseñaron seis cebadores específicos contra las regiones conservadas de los genes que codifican la proteína de la matriz y nucleocápside del hRSVA y hRSVB. Se utilizaron secuencias que representaban aislamientos del hRSV reportados en la base de datos de Genbank y provenientes de diversas áreas; los números de acceso para el virus hSRVA fueron: JF920063/JF920061/JF920062/FJ614813/AY911262, y para el virus hSRVB: JQ582843/NC_001781/AF013254/AF013255/AF013255/JQ582844.

Para el alineamiento se utilizó la herramienta Clustal W contenido en el programa MEGA, versión 6. Una vez alineadas las secuencias conservadas, se diseñaron los cebadores para el LAMP con el programa en línea Primer Explorer, versión 4 (Eiken Chemical Co., Tokio, Japón) (http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html), en el cual se generó un juego de seis cebadores, incluidos dos cebadores externos, sentido y antisentido (F3 y B3), dos cebadores internos (FIP y BIP), y dos cebadores de tipo bucle (LF y LB).

Para el diseño, se combinó la configuración estándar del Primer Explorer con las recomendaciones de la casa comercial Lucigen (https://www.lucigen.com/docs/manuals/Design-of-LAMP-primers-11-2015.pdf). La secuencia de los cebadores seleccionados se presenta en el cuadro 1. La especificidad de los cebadores escogidos se evaluó con la herramienta BLAST (11). Todos los cebadores se sintetizaron según las instrucciones del fabricante (Integrated DNA Technologies Inc, IDT®, USA).

**Cuadro 1.** Secuencias de los cebadores usados en el RT-LAMP (M) para la amplificación del hSRVA y el hSRVB

| Nombre del cebador | Secuencia de cebadores (5´ - 3´) |
|---|---|
| hSRVA | |
| F3 | AGTGAAACAAATATCCACACC |
| B3 | CATAGTGAGATCTTTAACTGTAGT |
| FIP | TGGTAAATTTGCTGGGCATTTG-AGGGACCTTCATTAAGAGTCA |
| BIP | CCAATGTGTCCTTGGATGAAAGAA-TTTTAGGCATGTTAGACTGC |
| LF | GCACTGCACTTCTTGAGTTTATCA |
| LB | CTGGCATATGATGTAACCACACCCT |
| hSRVB | |
| F3 | TCATTGCTGTCATTAACTCAA |
| B3 | TTATGGCTTCCAATTCTTCTG |
| FIP | CCTCTATACTCTCCCATTATGCCTA-TCCTAACTTCTCAAGTGTGG |
| BIP | GGATCTTTATGATGCAGCCAAAGC-CTGTTAAGTCTAATACACTGTAGT |
| LF | CCTGCTGCATTGCCTAGGA |
| LB | ATGCAGAGCAACTCAAAGAAAATGG |

Para la corrida de las pruebas de RT-LAMP se utilizó un estuche disponible en el comercio, el cual contiene una mezcla maestra con tampón optimizado, la enzima ADN polimerasa GspSSD LF con actividad de transcriptasa inversa y un colorante fluorescente (Isothermal Mastermix ISO-004; Optigene Limited, UK).

Se mezclaron 7,5 µL de la mezcla maestra con 2,5 µL de los seis cebadores de hSRVA o hSRVB (F3/B3 a 0,2 µM; FIP/BIP a 0,8 µM; LF/LB a 0,4 µM) y 2,5 µL de ARN molde, todo en un volumen final de reacción de 12,5 µL.

Las concentraciones de los cebadores se establecieron de acuerdo con lo reportado por Mahony, *et al.* (12) y Mu, *et al.* (10).

La amplificación se hizo a 62 °C durante 30 a 45 minutos según las instrucciones del fabricante. El corrido se llevó a cabo en un termociclador en tiempo real (Instrument ABI 7500™, Applied Biosystems, Foster City, CA) en el que la fluorescencia emitida con longitud de onda de 520 nm se representó gráficamente como curvas de reacción.

La prueba se consideró positiva siempre y cuando la fluorescencia detectada presentara una curva de función sigmoide similar a la del control positivo. Los tiempos (en minutos) de detección se registraron y se compararon con el control. Además, todos los productos amplificados se corrieron en geles de agarosa al 1,5 % y se visualizaron con la tinción en gel SYBR Safe DNA Gel Stain™ (Invitrogen) en un transiluminador de luz UV (BioRad).

### *Límite de detección*

El punto final de la detección mediante RT-LAMP se determinó haciendo diluciones seriadas del genoma viral de la cepa del hSRVA cultivado en el laboratorio en un rango de $10^{-1}$ (1,38 x $10^{9}$ copias de ARN de RSV-A rgRSVA

A2/por reacción) hasta $10^{-12}$ (1,38 x $10^{1}$ copias de ARN de RSV-A rgRSVA A2/por reacción), usando como diana el gen M (matriz) y las condiciones térmicas del estuche Isothermal Mastermix ISO-004™ (Optigene Limited).

Se utilizó el sistema en tiempo real ABI 7500™ (Applied Biosystems, Foster City, CA) y el programa SDS, version 1.4™ (Applied Biosystems, Foster City, CA) para el análisis de la fluorescencia de amplificación.

Una vez completada la amplificación, el límite de detección se consideró como la mayor dilución que mostrara una curva sigmoidea por encima del umbral del ciclo (*cycle threshold*, Ct) asignado por el equipo, y el resultado se expresó como el número de copias de ARN del RSV por reacción.

***Ensayo y validación de la prueba RT-LAMP***

Los ARN virales obtenidos se analizaron mediante tres técnicas moleculares diferentes:

1. una prueba de RT-PCR anidada;
2. la RT-LAMP (M) diseñada en este estudio versus otra RT-LAMP (L) de validación, y
3. una prueba de qPCR disponible comercialmente.

En primer lugar, la RT-PCR anidada es la técnica utilizada actualmente en el Instituto Nacional de Salud para determinar la frecuencia de 15 agentes virales asociados con infecciones respiratorias, y que en este estudio se utilizó como prueba de referencia (13).

En segundo lugar, la prueba RT-LAMP (M) para los virus hSRVA y hSRVB, se validó con un juego de cebadores para la RT-LAMP (L) reportado previamente por Mu, *et al.* (10).

Por último, los resultados de ambas pruebas de RT-LAMP se compararon con una qPCR para la detección del hSRVA y el hSRVB de la casa comercial Primerdesign Ltd. (genesig Path-RSV-A/B™), con el fin de calcular la sensibilidad y la especificidad de la prueba desarrollada en este estudio.

En todos los experimentos se utilizó como control positivo la cepa RSV-A2 recombinante, la cual expresa la proteína verde fluorescente (GFP; rgRSV), cultivada en el laboratorio (14). Todas las pruebas de RT-LAMP se hicieron de forma ciega, y en ninguno de los casos el operador conocía los resultados de las otras tres pruebas moleculares utilizadas.

***Análisis estadístico***

El análisis estadístico se hizo con el programa IBM SPSS Statistics™, versión 24. La sensibilidad, la especificidad y la razón de verosimilitud de la RT-LAMP se calcularon utilizando el programa Epidat, versión 3.1. El valor positivo en la razón de verosimilitud se definió dividiendo la tasa de verdaderos positivos por los falsos positivos, en tanto que el valor negativo se obtuvo dividiendo la tasa de falsos negativos por los verdaderos negativos. En todas las mediciones se calculó el intervalo de confianza de 95 %. La RT-PCR anidada se utilizó como la prueba de referencia para el diagnóstico de infección por VSR (11). El grado de concordancia entre los resultados de las pruebas se determinó por el valor de kappa (κ) con un intervalo de confianza de 95 %. Los valores de kappa mayores a 0,7 se consideraron como correspondientes a una concordancia alta.

## Resultados

### *Virus respiratorios*

Las 304 muestras utilizadas en este estudio se evaluaron inicialmente mediante la prueba RT-PCR anidada tal como se describió en la sección de materiales y métodos. Mediante este método, estandarizado y publicado por el Instituto Nacional de Salud (13), se detectan 15 agentes virales asociados con infecciones respiratorias.

Se encontraron 78 muestras positivas para hSRVA y ninguna para el subtipo B (hSRVB) ; 153 muestras positivas para uno o más agentes patógenos respiratorios distintos al hRSV (3 para metaneumovirus humano, 8 para adenovirus, 10 para bocavirus, 12 para parainfluenza, 14 para coronavirus, 10 para rinovirus, 2 para enterovirus, 10 para el virus de influenza $H_1N_1$, y 84 para dos o más virus), y 73 muestras negativas para todos los virus evaluados.

A partir de estos datos se determinó que la prevalencia de infección por hRSV era de 25,65 % ($IC_{95\%}$: 20,72-30,59 %) en la población estudiada, cuya edad media fue de 17,04 meses (desviación estándar: 15,75).

### *Especificidad de los cebadores para la RT-LAMP*

La especificidad de los cebadores (cuadro 1) se evaluó con ARN preparado a partir de la cepa estándar de laboratorio RSV-A2 y de las 153 muestras positivas para otros virus respiratorios.

Los cebadores del RT-LAMP (M) para el hSRVA amplificaron el segmento diana de la cepa RSVA-A2, en tanto que los cebadores del RT-LAMP (M) para el hSRVB no amplificaron el genoma viral de la cepa utilizada como control (figura 1).

En cuanto a las muestras positivas para otros virus, se observó que la prueba RT-LAMP (M) para el hSRVA y el hSRVB resultó negativa en todos los casos, con lo cual se demostró que los cebadores fueron 100 % específicos.

Por otro lado, estas muestras se probaron con el juego de cebadores de la RT-LAMP (L) reportados por Mu, *et al.* (10), y los resultados fueron idénticos a los encontrados con el juego de cebadores diseñados para este estudio. Además, la prueba de qPCR para el hSRVA y el hSRVB validó lo encontrado por las dos pruebas de RT-LAMP.

Cabe resaltar que el hSRVB no se detectó en ninguna de las muestras evaluadas con la RT-PCR anidada ni con el juego de cebadores de la RT-LAMP (M) diseñados en este estudio, lo que indica que este subtipo viral no circuló durante el periodo de muestreo. Con la prueba de RT-LAMP (M) fue posible detectar hasta 1,38 $x10^3$ copias de ARN/rgRSVA-A2 por reacción.

### *Evaluación de la prueba RT-LAMP*

En el cuadro 2 se evidencia que 89 muestras (29,27 %) fueron positivas para el hSRVA en la prueba de RT-LAMP (M), en tanto que 74 (24,34 %) lo fueron en la RT-LAMP (L) de Mu, *et al.* (10), y 84 (27,63 %) en la qPCR. Estos resultados indican que la RT-LAMP (M) desarrollada en este estudio tuvo mayor sensibilidad para detectar el hRSVA que las otras pruebas.

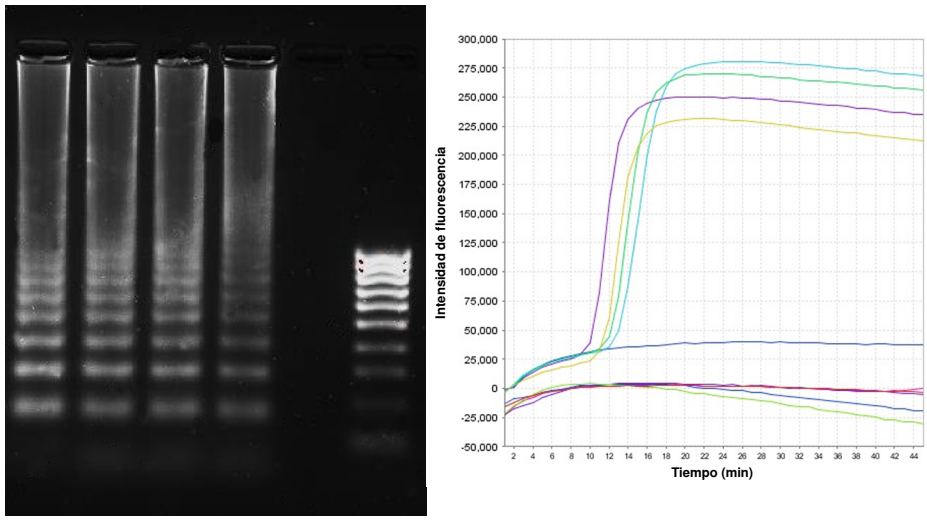



**Figura 1.** Especificidad de los cebadores de la prueba de RT-LAMP para el hSRV, subtipos A y B.

**A.** Detección específica del hSRV, subtipo A, utilizando el juego de cebadores diseñados en este estudio (diseñados) y el juego de cebadores publicados por Mu, *et al.* Los cebadores de la RT-LAMP para el hSRV, subtipo B (hSRVB), no amplificaron el genoma viral de la cepa hRSVA-A2 utilizada como control. En ningún caso se observó reacción cruzada entre el hSRVA y el hSRVB. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de los productos de la RT-LAMP (M). Marcador de peso molecular de 100 pb

**B.** Curvas de amplificación en tiempo real de la sección A. Se indica el tiempo de reacción (en minutos) versus la intensidad relativa de fluorescencia para amplificar el genoma viral de la cepa de control (cepa hRSVA-A2). En ninguna de las réplicas de los cebadores del hSRVB se obtuvo una señal de fluorescencia mayor de 2,5 x 104 comparada con el control positivo detectado por los cebadores para el hSRVA. Todos los valores de fluorescencia que superaron los valores de 2,5 x 104 durante el tiempo de reacción se consideraron como positivos. Las reacciones se llevaron a cabo en el sistema en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems) durante 45 minutos.

**Cuadro 2.** Grado de concordancia entre las pruebas evaluadas para la detección del hSRVA

| Prueba | RT-PCR anidada | | | Kappa (κ) | $IC_{95}$% |
|---|---|---|---|---|---|
| | Positivo | Negativo | Subtotal | | |
| RT-LAMP (M) | | | | | |
| Positivo | 73 | 16 | 89 | 0,83 (0,036) | 0,756-0,897 |
| Negativo | 5 | 210 | 215 | | |
| Subtotal | 78 | 226 | 304 | | |
| RT-LAMP (L)* | | | | | |
| Positivo | 62 | 12 | 84 | 0,75 (0,043) | 0,668-0,840 |
| Negativo | 16 | 214 | 240 | | |
| Subtotal | 78 | 226 | 304 | | |
| qPCR † | | | | | |
| Positivo | 64 | 20 | 84 | 0,714 (0,045) | 0,624-0,803 |
| Negativo | 14 | 206 | 220 | | |
| Subtotal | 78 | 226 | 304 | | |

* Juego de cebadores reportados por Mu, *et al.* (9)
† Prueba disponible comercialmente (genesig® Path-RSV-A™)

Cabe resaltar que las tres pruebas se compararon con el método de referencia. En cuanto al nivel de concordancia entre las pruebas, se observó que 73 muestras positivas y 210 negativas concordaron con la RT-LAMP (M) y la RT-PCR anidada, es decir que la concordancia general fue de 93,09 % (κ=0,83; IC: 0,756-0,897); sin embargo, hubo 16 muestras que solamente resultaron positivas en la RT-LAMP (M) (falsos positivos); del mismo modo, cinco muestras que resultaron negativas (falsos negativos) en la RT-LAMP (M) fueron positivas en la RT-PCR anidada (cuadro 2).

La tasa de falsos negativos de la prueba RT-LAMP (M) se asoció con una carga viral baja, hecho que se correlacionó con valores altos en los Ct calculados en las pruebas de qPCR, los cuales se emplearon para comparar y validar estos resultados. De esta forma, los valores de Ct mayores o iguales a 30,65 ($IC_{95\%}$: 25,60-34,37) se presentaron en muestras clasificadas como falsos negativos en la prueba de RT-LAMP (M), en tanto que los valores de Ct menores o iguales a 23,91 ($IC_{95\%}$: 22,22-26,94) se presentaron en las muestras con resultados verdaderos positivos en la RT-LAMP ($p<0,01$).

### *Desempeño diagnóstico de la RT-LAMP*

Un hecho importante cuando se busca introducir este tipo de técnicas en el diagnóstico clínico es la posibilidad de detectar el agente patógeno en un corto tiempo. En este estudio se determinó que el tiempo promedio total para obtener un resultado positivo en la RT-LAMP (M) fue de 19,4 minutos ($IC_{95\%}$: 18,45-20,35 minutos) (figura 2), comparado con los 60 a 90 minutos requeridos en la qPCR o con los 300 minutos necesarios para correr la prueba de referencia, es decir, la RT-PCR anidada (13).

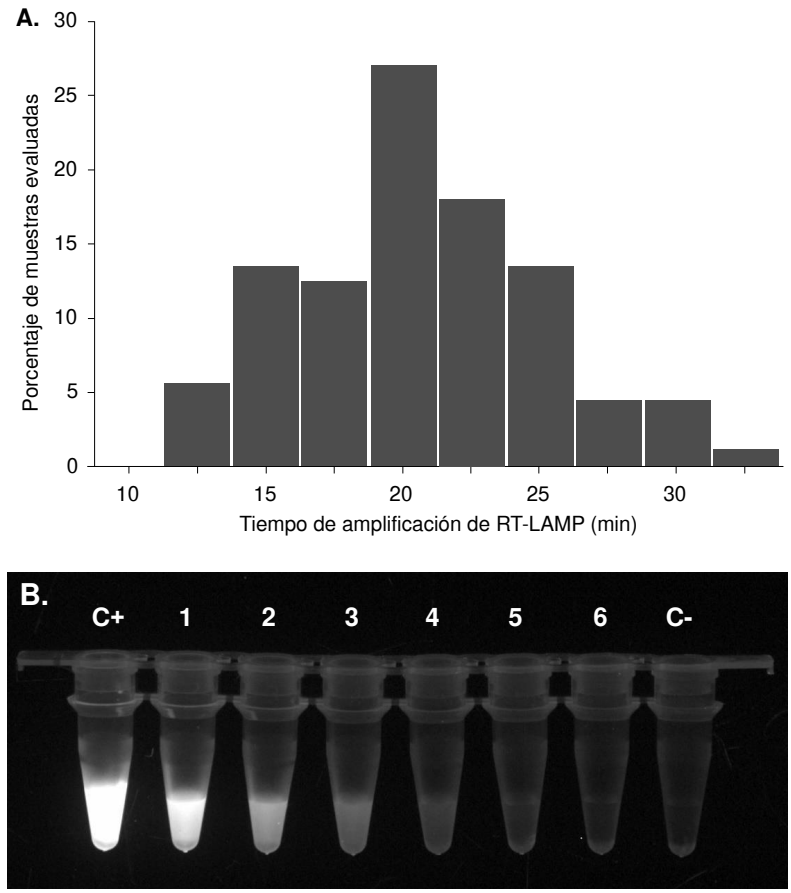



**Figura 2.** Tiempo promedio de detección del hSRVA en muestras de hisopados nasofaríngeos. **A.** El 84,3 % de las muestras positivas se detectó en 15 a 25 minutos, con una media de 19,4 minutos. El tiempo promedio de amplificación del genoma viral de la cepa de control (hRSVA-A2) en cinco experimentos independientes fue de 12,72 minutos. **B.** Visualización de muestras positivas y negativas con un transiluminador de luz ultravioleta según el tiempo de detección. Las muestras enumeradas como 1-2-3 y 4 se registraron como positivas para el virus hSRVA en 15 a 25 minutos de corrida de la RT-LAMP (M). Las muestras 5 y 6 fueron negativas después de 45 minutos de corrida, similar a lo ocurrido con el control negativo.

C+: control positivo; C-; control negativo

Otro aspecto que puede resaltarse en el ensayo desarrollado en este estudio es que en cerca del 90 % de las muestras en las que se obtuvo un resultado positivo, el tiempo de detección fue menor o igual a 25 minutos (figura 2).

En cuanto al desempeño diagnóstico de la RT-LAMP (M), la RT-LAMP (L) y la qPCR, comparadas con la RT-PCR anidada (cuadro 3), en la prueba del estudio se obtuvo una sensibilidad de 93,59 % ($IC_{95\%}$: 87,51-99,67 %), una especificidad de 92,92 % ($IC_{95\%}$: 89,36-96,49 %), una razón de verosimilitud positiva de 13,22 ($IC_{95\%}$: 8,21-21.28) y una negativa de 0,07 ($IC_{95\%}$: 0,03-0,16), en tanto que la RT-LAMP (L) reportada por Mu, *et al.* (10) tuvo una sensibilidad de 79,49 % ($IC_{95\%}$: 69,89-89,09 %), una especificidad de 94,69 % ($IC_{95\%}$: 91,55-97,83 %), una razón de verosimilitud positiva de 14,97 ($IC_{95\%}$: 8,53-26,26) y una negativa de 0,22 ($IC_{95\%}$: 0,14-0,34), y una concordancia general de 90,79 % ($IC_{95\%}$: 87,37-94,20 %).

Por último, en la qPCR se obtuvo una sensibilidad de 82,05 % ($IC_{95\%}$: 72,89-91,21 %), una especificidad de 91,15 % ($IC_{95\%}$: 87,23-95,07 %), una razón de verosimilitud positiva de 9,27 ($IC_{95\%}$: 6,02-14,27) y una negativa de 0,20 ($IC_{95\%}$: 0,12-0,32), en tanto que la concordancia general de la qPCR fue de 88,81 % ($IC_{95\%}$: 86,32-94,07 %).

## Discusión

En este estudio se diseñó una prueba diagnóstica de RT-LAMP cuyos cebadores amplificaban una secuencia altamente conservada en la región codificante de la proteína de la matriz (M) para la detección rápida del hSRVA a partir de muestras clínicas de nasofaringe obtenidas de niños menores de cinco años.

La prueba de RT-LAMP (M) desarrollada en este estudio demostró tener mayor sensibilidad (93,59 %), especificidad (92,92 %) y concordancia (0,83 ± 0,036) para detectar la presencia del hSRVA que la prueba de RT-PCR anidada, aplicada rutinariamente en el Instituto Nacional de Salud de Colombia, y que en este estudio se usó como la prueba de referencia.

La RT-LAMP (M) diseñada en el estudio también se comparó con una de RT-LAMP (L) previamente reportada por Mu, *et al.*, y con una qPCR. El índice kappa de la prueba diseñada en este estudio fue superior, en tanto que los valores de la RT-LAMP (L) y la qPCR concordaron (0,75 ± 0,043 y 0,71 ± 0,045, respectivamente), lo que demostró que su dinámica es mejor que la de las otras pruebas moleculares.

La prueba RT-LAMP (M) demostró tener mejor sensibilidad y un mayor índice de kappa comparada con la RT-LAMP (L) previamente diseñada por Mu, *et al.*, la cual solo logró un nivel de sensibilidad de 79,49 % y una concordancia de 0,75 ± 0,043, muy por debajo de los valores encontrados

**Cuadro 3.** Desempeño diagnóstico de la RT-LAMP (M) evaluada para la detección del virus sincicial respiratorio (VSR)

| Prueba | Resultado | RT-PCR anidada | | Sensibilidad % ($IC_{95}$%) | Especificidad % ($IC_{95}$%) | Razón de verosimilitud positiva ($IC_{95}$%) | Razón de verosimilitud negativa ($IC_{95}$%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Positivo | Negativo | | | | |
| RT-LAMP (M) | Positivo | 73 | 16 | 93,59 | 92,92 | 13,22 | 0,07 |
| | Negativo | 5 | 210 | (87,51-99,67) | (89,36-96,49) | (8,21-21,28) | (0,03-0,16) |
| RT-LAMP (L) | Positivo | 62 | 12 | 79,49 | 94,69 | 14,97 | 0,22 |
| | Negativo | 16 | 214 | (69,89-89,09) | (91,55-97,83) | (8,53-26,26) | (0,14-0,34) |
| qPCR | Positivo | 64 | 20 | 82,05 | 91,15 | 9,27 | 0,20 |
| | Negativo | 14 | 206 | (72,89-91,21) | (87,23-95,07) | (6,02-14,27) | (0,12-0,32) |

en la prueba aquí diseñada. Aún más, la prueba de qPCR disponible comercialmente tuvo la menor sensibilidad (82,05%) y el índice kappa más bajo (0,714 ± 0,045) de las tres pruebas evaluadas.

Es posible concluir que la gran sensibilidad y el alto índice de concordancia de la prueba RT-LAMP (M) comparada con la RT-LAMP (L) y la qPCR, se debe a que los cebadores diseñados estaban dirigidos a una secuencia altamente conservada de la región codificadora para la proteína de la matriz (M) del virus, lo cual difiere de las secuencias diana de los cebadores de Mu, *et al*., (los cuales estaban dirigidos contra la región codificadora de la proteína L), y de la prueba comercial de qPCR, cuyos cebadores están dirigidos contra la región codificante de la proteína N.

Es de resaltar que el uso de una 'mezcla maestra' estandarizada (Optigene, United Kingdom) que contenía los reactivos necesarios pudo haber contribuido a los altos valores de sensibilidad y concordancia observados con la prueba diseñada en el estudio. Estos resultados concuerdan en gran medida con la prueba diseñada por Mahony, *et al*., quienes también emplearon la misma 'mezcla maestra' comercial (12).

Los cebadores diseñados para la prueba de RT-LAMP (M) fueron específicos para detectar el hSRVA, pues no detectaron otros virus respiratorios como el metaneumovirus humano, el adenovirus, el bocavirus, el virus de la parainfluenza, el coronavirus, el rinovirus, el enterovirus y el virus de influenza $H_1N_1$, aun cuando estaban presentes, tal como se evidenció en la prueba RT-PCR anidada del Instituto Nacional de Salud.

La RT-LAMP (M) y la RT-LAMP (L) tuvieron un buen desempeño comparadas con la RT-PCR anidada. Las razones de verosimilitud positivas de ambas pruebas se consideran muy buenas (>10), lo que demuestra una buena capacidad de confirmación en caso de sospecha de infección por el hSRVA. Al comparar las pruebas de RT-LAMP y RT-LAMP (M) se obtuvo una razón de verosimilitud negativa bastante buena (0,07; $IC_{95\%}$: 0,03-0,16), y mejor que la de la RT-LAMP (L), lo cual evidenció que con un resultado negativo se puede descartar una infección por el hSRVA con bastante confianza.

La prueba diseñada en el estudio detectó hasta $1,38 \times 10^3$ copias del genoma del virus por volumen de reacción. En otras pruebas de RT-LAMP diseñadas recientemente por Hoos, *et al*. (15), se logró una sensibilidad analítica de 2.425 copias del genoma del virus por volumen de reacción, el doble de lo detectado con la prueba de estudio; sin embargo, no se pueden comparar estos resultados de sensibilidad analítica con los reportados por el grupo de Hoos (15), ya que ellos usaron genes clonados del hSRVA en plásmidos y en este estudio se utilizó el genoma aislado de virus cultivados en el laboratorio, por lo que los resultados de sensibilidad analítica del presente estudio simulan con mayor precisión los títulos virales presentes en los pacientes infectados.

La prueba de RT-LAMP (M) del presente estudio ofrece ventajas comparativas con respecto a la RT-PCR anidada: en primer lugar, la prueba de estudio tuvo un costo de aproximadamente USD$ 4 (costos directos); en segundo lugar, se obtuvieron resultados en menos de una hora, sin incluir el tiempo invertido en la toma de la muestra ni en la obtención del genoma viral, en tanto que con la RT-PCR anidada se obtuvieron resultados solo después de cinco horas. A pesar de que con la RT-LAMP (M) y la RT-PCR anidada se pueden analizar muestras individuales, esta última es dispendiosa, ya que necesita verificación electroforética, lo que incrementa ligeramente su costo.

Por otro lado, la RT-LAMP (M) comparada con la qPCR ofrece la ventaja de no requerir una curva de calibración. El hecho de que la RT-LAMP emplee una enzima isotérmica evita la inversión en equipos costosos como el termociclador. Es importante tener en cuenta que en este estudio se utilizó un sistema de detección en tiempo real para monitorizar la amplificación solo con fines de estandarización, y que todos los productos generados por la RT-LAMP también se visualizaron mediante la adición de colorantes como el SYBR Green™, el cual permitió observar fluorescencia bajo luz ultravioleta en un transiluminador, instrumento de muy bajo costo y de fácil adquisición (5). Estos resultados indican que su utilidad clínica es considerable, dado que el tiempo para obtener resultados y los costos son menores que los de las pruebas de qPCR.

La obtención apropiada de la muestra es clave en la detección viral. En este estudio se empleó un cepillo FLOQswabs™ para la toma de muestras clínicas y estas se transportaron en medio de transporte universal con antibióticos (UTM Viral Transport Media™, USA). El cepillo empleado es conveniente debido a que sus fibras de nylon facilitan que la muestra quede expuesta, lo que permite una fácil elución para la obtención posterior del material genético de los virus. Sin embargo, en los estudios de Mahony, *et al.*, se evidenció que una RT-LAMP realizada a partir de especímenes directos podría ser adecuada y efectiva para detectar con mayor rapidez el hSRVA, aunque solo se evaluaron 16 muestras. Otros autores (16,17) han defendido el uso de un lavado nasal como una forma rápida y directa de detección de los virus, pero este tipo de métodos tiene la desventaja de producir broncoaspiración en los pacientes pediátricos, lo cual puede generar riesgos innecesarios.

El virus hRSV más frecuente fue el subtipo A, lo que confirma lo reportado en los estudios epidemiológicos de este virus. No se encontró el hSRVB en las muestras analizadas, lo que indicó que no circulaba en Barranquilla durante el tiempo del muestreo. Infortunadamente, no se contó con una cepa viral de este tipo para evaluar directamente los cebadores diseñados para el hSRVB. Sin embargo, puede afirmarse que este subtipo viral no circuló durante el periodo de estudio, porque las tres pruebas adicionales evaluadas (RT-PCR anidada, RT-LAMP (L), y qPCR VSRB) no arrojaron datos positivos.

Esto da una idea de cuál podría ser el comportamiento epidemiológico del virus en esta región del país, lo que es de suma importancia para la selección de vacunas contra este agente patógeno. Se está pensando llevar a cabo estudios de secuenciación genómica en la búsqueda de posibles variantes genómicas de los virus circulantes. En este estudio se reportó una RT-LAMP de gran sensibilidad y un alto índice de concordancia con respecto a la RT-PCR anidada empleada en el Instituto Nacional de Salud. La prueba, además, es fácil de hacer, económica y de un solo paso. El reto ahora consiste en desarrollar una plataforma que permita detectar hasta ocho tipos de virus respiratorios con una sola prueba (18,19).

## Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al personal del hospital de la Universidad del Norte en Barranquilla, por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

## Referencias

1. Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EA, Madhi SA, Gessner BD, *et al*. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: A systematic review and modelling study. Lancet. 2017;390:946-58. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30938-8

2. Vergara HSJ, Gutiérrez MA, Mohapatra SS. Biología molecular del virus sincitial respiratorio y desarrollo de estrategias profilácticas. Salud Uninorte. 2012;22,:135-53.
3. Henrickson KJ, Hoover S, Kehl KS, Hua W. National disease burden of respiratory viruses detected in children by polymerase chain reaction. Pediatr Infect Dis J. 2004; 23 (1 Suppl): S11-8. https://doi.org/10.1097/01.inf.0000108188.37237.48
4. Tillmann RL, Simon A, Muller A, Schildgen O. Sensitive commercial NASBA assay for the detection of respiratory syncytial virus in clinical specimen. PLoS One. 2007;2:e1357. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001357
5. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000;28:E63.
6. Manji R, Lotlikar M, Zhang F, Ginocchio CC. Clinical evaluation of NucliSENS magnetic extraction and NucliSENS analytical specific reagents for the real-time detection of respiratory syncytial virus (RSV) in paediatric respiratory specimens. J Clin Pathol. 2009;62:998-1002. https://doi.org/10.1136/jcp.2009.066688
7. Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. J Biochem Biophys Methods. 2007;70:499-501. https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.08.008
8. Tang Q, Tian S, Yu N, Zhang X, Jia X, Zhai H, *et al.* Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol. 2016;54:950-5. https://doi.org/10.1128/JCM.01751-15
9. Tsai SM, Chan KW, Hsu WL, Chang TJ, Wong ML, Wang CY. Development of a loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of orf virus. J Virol Methods. 2009;157:200-4. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.01.003
10. Mu Y, Zeng J, Chen Q, Liu J, Wang L, Yao F, *et al.* New method for the visual detection of human respiratory syncytial virus using reverse transcription loop-mediated amplification. J Virol Methods. 2014;206:84-8. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.06.005
11. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes. 2002;16:223-9. https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415
12. Mahony J, Chong S, Bulir D, Ruyter A, Mwawasi K, Walthob D. Development of a sensitive loop-mediated isothermal amplification assay that provides specimen-to-result diagnosis of respiratory syncytial virus infection in 30 minutes. J Clin Microbiol. 2013;51: 2696-2701. https://doi.org/10.1128/JCM.00662-1312
13. Barbosa-Ramírez J, Pulido-Domínguez P, Rey-Benito G, Méndez-Rico J, Castellanos J, Páez-Martínez A. Human respiratory syncytial virus and metapneumovirus in patients with acute respiratory infection in Colombia, 2000 - 2011. Rev Panam Salud Pública. 2014;36:101-9.
14. San-Juan-Vergara H, Sampayo-Escobar V, Reyes N, Cha B, Pacheco-Lugo L, Wong T, *et al.* Cholesterol-rich microdomains as docking platforms for respiratory syncytial virus in normal human bronchial epithelial cells. J Virol. 2012;86:1832-43. https://doi.org/10.1128/JVI.06274-11
15. Hoos J, Peters R, Tabatabaia J, Grulich-Henna J, Schnitzler P. Pfeila J. Reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification forrapid detection of respiratory syncytial virus directly fromnasopharyngeal swabs. J Virol Methods. 2017;242:53-7. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.01.006
16. Heikkinen T, Marttila J, Salmi AA, Ruuskanen O. Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. J Clin Microbiol. 2002;40:4337-9. https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4337-4339.2002
17. Hall CB, Douglas Jr RG. Clinically useful method for the isolation of respiratory syncytial virus. J Infect Dis.1975;131:1-5.
18. Zhou H, Zhao M, Li X, Zhang D, Zhou S, Chen C, *et al.* Clinical evaluation of the isothermal amplification assays for the detection of four common respiratory viruses in children with pneumonia. Arch Virol. 2017;162:1311-8. https://doi.org/10.1007/s00705-017-3227-2
19. Koo B, Jin CE, Lee TY, Lee JH, Park MK, Sung H, *et al.* An isothermal, label-free, and rapid one-step RNA amplification/detection assay for diagnosis of respiratory viral infections. Biosens Bioelectron. 2017;90:187-94. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.051